

Direkter Elektronentransfer und Bioprozessregelung mit Dickschicht-Enzymelektroden

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Jens Thomas Schumacher
aus Braunschweig

1. Referentin: Frau apl. Prof. Dr. Ursula Bilitewski

2. Referent: Herr Prof. Dr. Klaus Buchholz

eingereicht am: 16.05.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.09.2002

Druckjahr: 2002

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schmidt, A., Schumacher, J.T., Reichelt, J., Hecht, H.J. & Bilitewski, U.: Mechanistic and Molecular Investigations on Stabilization of Horseradish Peroxidase C. *Analytical Chemistry*, V. 74: No. 13, 3037-3045 (2002).

Castilho, L.R., Schumacher, J., Nothnagel, J., Anspach, F.B. & Deckwer, W.D.: Automated perfusion cultivation of CHO cells for the production of a recombinant human anti-HIV antibody. *Jahrestagung der Brasilianischen Gesellschaft für Biotechnologie* (November 2001).

Schumacher, J.T., Hecht, H.J., Dengler, U., Reichelt, J. & Bilitewski, U.: Direct electron transfer observed for peroxidase to screen-printed graphite electrodes. *Electroanalysis*, V. 13, No. 8-9: 779-785 (2001).

Schumacher, J.T., Münch, I., Richter, T., Rohm, I. & Bilitewski, U.: Investigations with respect to Stabilization of Screen-Printed Enzyme Electrodes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 7, No. 1-4: 67-76 (1999).

Tagungsbeiträge

Schumacher, J.T.: Direct electron transfer observed for peroxidase to screen-printed graphite electrodes. (Vortrag) 8th International Conference on ElectroAnalysis, Bonn (11.-15. Juni 2000).

Schumacher, J.T.: Principles of Flow Injection Analysis, a Tool for Sensor Testing. (Vortrag) Biosensors Summer School in Kusadasi, Türkei (20.-26. Juni 1999).

Schumacher, J.T.: Application of Enzyme Electrodes to Bioprocess Monitoring. (Vortrag) Biosensors Summer School in Kusadasi, Türkei (20.-26. Juni 1999).

Schumacher, J.T.: Charakterisierung von siebgedruckten Dickschichtelektroden und ihr Einsatz als Biosensor. (Vortrag) 5. Doktorandentreffen der Elektroanalytiker, Bochum (09.-11. Juni 1999).

Schumacher, J.T., Dengler, U., Reichelt, J., Hecht, H.J. & Bilitewski, U.: Experimentelle Daten und Modellierung der Wechselwirkungen von Peroxidase mit diversen Additiven. (Poster) Deutsches BioSensor-Symposium, München (14.-16. April 1999).

Schumacher, J.T.: Investigations with respect to Stabilization of Screen-Printed Enzyme Electrodes. (Vortrag) The First International Conference on Protein Stabilisation, Leeds, Großbritannien, (28. Juni - 01. Juli 1998).

Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Ursula Bilitewski für die Betreuung meiner Arbeit, ihre stete Diskussionsbereitschaft und Loyalität. Sie ermöglichte und förderte jederzeit mein freies wissenschaftliches Wirken.

Für die unkomplizierte Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Buchholz.

Ein herzlicher Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit gebührt meinen internen Projektpartnern Sabine Weißflog, Dr. Anja Schmidt, Dr. Hans-Jürgen Hecht, Dr. Joachim Reichelt und Dr. Uwe Dengler aus der Abteilung Strukturforschung.

In Erinnerung bleiben werden mir auch die gemeinsam durchgeführten Fermentationen mit Dr. Leda Castilho, Gerd-Walther Piehl, Jürgen Nothnagel und Dr. Markus Ganzlin, denen ich ebenso für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danken möchte.

Frau Dr. Irina Gazaryan danke ich für die Überlassung der rekombinant hergestellten Peroxidase. Auch möchte ich mich für die jeweils sehr gelungenen REM-Aufnahmen bei Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf sowie für die AFM-Aufnahmen bei Herrn Ludger Weisser bedanken.

Bei meinen Freunden und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe Bioanalytik/Biosensorik bedanke ich mich für die gedeihliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere einen herzlichen Dank an Renate Kast und Dr. Adrian Klein für die Kameradschaft in Labor und Büro sowie viele Tassen Tee. Auch danke ich besonders Akin Akkoyun für die schöne gemeinsame Dienstreise in die Türkei und ebenso Björn Henze, der sich immer engagiert (und erfolgreich) um leidige Computerprobleme in unserer Gruppe kümmerte. Dank auch an meine Praktikanten Bianca Rook, Holger Franz und Philip Stegmeier für die gute Mitarbeit. Vielen Dank auch meinen Freunden und Kollegen aus den anderen Bereichen der GBF für die schöne Zeit, die wir am Mittagstisch, beim Lauftreff und an den Spieleabenden hatten.

Großen Dank schulde ich meinen Eltern und Großeltern, die mich immer vorbehaltlos unterstützt haben.

INHALT

1 EINLEITUNG	1
1.1 Zielsetzung	1
2 GRUNDLAGEN	3
2.1 Enzyme in der biochemischen Analytik mit amperometrischen Sensoren	3
2.1.1 Einsatz von Oxidasen	3
2.1.2 Direkter Elektronentransfer	3
2.1.3 Direkter Elektronentransfer mit Peroxidasen	5
2.1.4 Enzymstabilität	7
2.2 Elektrochemische Meßmethoden	9
2.2.1 Amperometrie	9
2.2.2 Zyklische Voltametrie	10
2.2.3 Dickschicht-Technik	11
2.3 Bioprozesstechnik	13
2.3.1 Bioprozessanalytik	14
2.3.2 Fließinjektions-Analyse (FIA)	14
2.3.3 Bioprozessanalytik mit Fließinjektions-Analyse (FIA)	15
2.3.4 Bioprozessregelung	17
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Chemikalien	20
3.2 Enzyme	21
3.3 Verwendete Puffer und Lösungen	21
3.4 Verwendete Elektroden	22
3.4.1 Dickschicht-Elektroden	22
3.4.2 Präparation der GOD- und LOD-Dickschicht-Sensoren	23
3.4.3 Präparation der Peroxidase-Sensoren	24
3.4.4 Festkörperelektroden	25
3.4.5 Referenzelektroden	25
3.5 Durchführung von Analysen und Charakterisierungen	25
3.5.1 Bestimmung der Proteinmassen durch Gelanalytik	25
3.5.2 Ermittlung des Proteingehalts gelöster Peroxidase	25
3.5.3 Bestimmung der Proteingröße durch Light-Scattering	26
3.5.4 Durchführung der Deglykosilierung	26
3.5.5 Aktivitätstest von gelöster HRP	26
3.5.6 Ermittlung der enzymatischen Aktivität immobilisierter HRP	27
3.5.7 Ermittlung der Dispersionskoeffizienten in den verwendeten FIA-Systemen	28
3.6 Modellierung der Wechselwirkungen von HRP mit Oberflächen und Additiven	29
3.6.1 Berechnung der Elektronentransferraten in nativer und rekombinanter HRP	29

3.6.2 Dockingberechnungen von nativer und rekombinanter HRP an einer Graphitoberfläche	29
3.6.3 Dockingberechnungen von Additiven mit nativer HRP	30
3.7 On-line Bioprozessanalytik	30
3.7.1 FIA zur Bioprozessanalytik bei Kultivierungen tierischer Zellen	31
3.7.2 Verwendetes Anschlußmodul von Fermenter zur FIA bei Kultivierungen tierischer Zellen	34
3.7.3 Komplettaufbau des Fermenters mit FIA-Apparatur	35
3.7.4 FIA zur Untersuchung von Elektroden und zum Einsatz bei Kultivierungen von <i>Aspergillus niger</i>	36
3.7.5 Prozessmonitoring bei Kultivierungen von <i>Aspergillus niger</i>	37
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1 Darstellung von direktem Elektronentransfer mit nativer und rekombinanter Peroxidase aus Meerrettich (HRP)	40
4.1.1 Charakterisierung der nativen und rekombinanten HRP	40
4.1.1.1 Bestimmung der Proteinmassen der nativen und rekombinanten HRP	40
4.1.1.2 Nachweis der Glykosilierungsstruktur der nativen HRP mit Hilfe von deglykosilierenden Enzymen	41
4.1.1.3 Bestimmung der Proteingrößen der nativen und partiell deglykosilierten HRP durch Light-Scattering	44
4.1.2 Untersuchungen mit nativer HRP in Lösung	45
4.1.2.1 Aktivitätsbestimmung gelöster HRP	45
4.1.2.2 Temperaturstabilität der nativen HRP	46
4.1.2.3 Langzeitstabilität gelöster nativer HRP	48
4.1.3 Untersuchungen mit Graphit-Dickschicht-Elektroden zum elektrochemischen Umsatz von Substrat und Mediator	53
4.1.3.1 Potentialüberprüfung der verwendeten Referenzelektroden	53
4.1.3.2 Reduktion von H ₂ O ₂ an Graphit-Dickschicht-Elektroden	54
4.1.3.3 Mediatorumsetzung an Graphit-Dickschicht-Elektroden	55
4.1.4 Untersuchungen mit Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektroden	57
4.1.4.1 Nachweis enzymatischer Aktivität in Lösung an einer Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit Hydrochinon durch zyklische Voltametrie	57
4.1.4.2 Nachweis enzymatischer Aktivität einer HRP-Graphit-UV-Pastenmembran mit Hydrochinon durch zyklische Voltametrie	58
4.1.4.3 Ermittlung der Sättigungskonzentrationen für das Substrat H ₂ O ₂ und den Mediator Hydrochinon bei HRP-Dickschicht-Elektroden im FIA-System	60
4.1.4.4 Arbeitsstabilität von HRP-Elektroden im FIA-System mit Gafquat 755N und Polyethylenimin als Additiv	63
4.1.4.5 Nachweis der Blindwerte an unbeschichteten und beschichteten Elektroden	64
4.1.4.6 Wirkung von Polylysin als Pastenbeimischung in HRP-Elektroden	65

4.1.4.7 Nachweis von direktem Elektronentransfer an Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektroden mit immobilisierter HRP durch zyklische Voltammetrie	66
4.1.4.8 Test auf Diffusionslimitierung von H_2O_2 in der UV-Pastenmembran	69
4.1.4.9 Nachweis von direktem Elektronentransfer von einer Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit nativer HRP durch Chronoamperometrie	70
4.1.4.10 Einfluß des pH-Wertes auf den direkten Elektronentransfer	71
4.1.5 Untersuchungen mit Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden	72
4.1.5.1 Direkter Elektronentransfer mit nativer und rekombinanter HRP	72
4.1.5.2 Nachweis enzymatischer Aktivität immobilisierter nativer und rekombinanter HRP mit dem Mediator Hydrochinon	73
4.1.5.3 Gafquat 755N als Additiv zur immobilisierten nativen und rekombinanten HRP	74
4.1.5.4 Interpretation der Docking-Simulationen mit Additiven zur HRP	77
4.1.5.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unbeschichteter Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden	79
4.1.5.6 Nachweis der unterschiedlichen Beschaffenheit der Enzymschicht mit und ohne Gafquat 755N als Additiv mit Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)	79
4.1.5.7 Einfluß der Enzymbeladung auf den direkten Elektronentransfer	81
4.1.6 Untersuchungen mit polierten Elektrode 423-SS -Dickschicht-Elektroden	82
4.1.6.1 Direkter Elektronentransfer mit nativer und rekombinanter HRP	82
4.1.6.2 Dextran-Sulfat und Polyethylenimin als Additive bei nativer und rekombinanter HRP	84
4.1.7 Untersuchung der Elektrodenmaterialien Glassy-Carbon und Graphit	87
4.1.8 Untersuchungen zur Stabilität von HRP-Elektroden	89
4.1.8.1 Arbeitsstabilität von HRP-Elektroden hinsichtlich der Messung mit Mediator	89
4.1.8.2 Arbeitsstabilität des direkten Elektronentransfers bei HRP-Elektroden	90
4.1.8.3 Lagerstabilität von HRP-Biosensoren	92
4.1.9 Interpretation der praktischen Ergebnisse mit Hilfe der Modellierung des direkten Elektronentransfers für native und rekombinante HRP	93
4.1.10 Diskussion der Resultate mit Peroxidase-Elektroden hinsichtlich direkten Elektronentransfers	98
4.2 Bioprozessanalytik und-regelung mit GOD-Sensoren im FIA-System	101
4.2.1 Charakterisierung der GOD-Sensoren	101
4.2.1.1 Eignung der Platin-Dickschicht-Elektroden zur Messung von H_2O_2	101
4.2.1.2 Eignung von Edelstahlrohrstutzen als Einlaß in der wall-jet-Zelle als Gegenelektrode	104
4.2.1.3 Vergleich der Arbeitsstabilität von GOD-Sensoren mit und ohne die stabilisierenden Additive BSA und Polylysin	104
4.2.1.4 Arbeitsstabilität eines GOD-Sensors mit Stabilisatoren	106
4.2.1.5 Lagerstabilität trocken gelagerter GOD-Sensoren mit Stabilisatoren	107

4.2.2 Bioprozessmonitoring bei Kultivierungen von <i>Aspergillus niger</i>	107
4.2.2.1 Bioprozessmonitoring mit niedriger Dispersion im FIA-System	108
4.2.2.2 Charakterisierung der FIA-Apparatur	111
4.2.2.3 Modifikation des GOD-Sensors	113
4.2.2.4 Bioprozessmonitoring mit hoher Dispersion und modifiziertem GOD-Sensor im FIA-System	115
4.2.2.5 Langzeitstabilität des modifizierten GOD-Sensors	117
4.2.2.6 Off-line Bestimmung von Fermenterproben aus Hefen-Kultivierung	118
4.2.2.7 Matrixeffekte beim Yellow-Springs-Analysator	119
4.2.3 Bioprozessregelung bei Kultivierungen tierischer Zellen	121
4.2.3.1 Charakterisierung der FIA-Apparatur zur Bioprozessregelung tierischer Zellkulturen	121
4.2.3.2 Steriltest der FIA-Anbindung und Sterilbrücke im Betrieb	123
4.2.3.3 Bioprozessregelung von CHO-Zellen in 2-Liter-Perfusionskultur mit Zellrückhaltung	123
4.2.3.4 Bioprozessregelung von HeLa-Zellen in 100-Liter-Perfusionskultur	126
4.2.3.4.1 Ziele der Kultivierung und ihre Randbedingungen	126
4.2.3.4.2 Entwicklung der Regelungsstrategie	127
4.2.3.4.3 Betrachtung des gesamten Kultivierungsverlaufes	132
4.2.3.5 On-line Bioprozessmonitoring mit LOD-Dickschicht-Elektroden	136
4.2.4 Diskussion der Resultate mit GOD- und LOD-Elektroden	137
 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	 139
 6 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	 141
 7 LITERATUR	 143

1 EINLEITUNG

Enzymelektroden sind etablierte Werkzeuge in der medizinischen Diagnostik zur Bestimmung von Glukose im Blut [1]) sowie in der off-line Bioprozessanalytik zur Bestimmung von Glukose und Laktat (Yellow-Springs Analyzer [2]). Kennzeichen der Enzymelektroden ist die Erfassung eines Stoffes, der an der jeweiligen enzymespezifischen Reaktion beteiligt ist. Der elektrochemische Umsatz dieses Parameters führt zu einem elektrischen Signal, welches in seiner Höhe der Konzentration dieses Stoffes entspricht. Gewählt werden in der Regel natürliche Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren (wie O_2 oder NAD(P)), durchaus häufig werden aber auch sogenannte Mediatoren (wie Ferrocen oder Hydrochinon) als Elektronenüberträger verwendet. Erwünscht ist eine hohe Zuverlässigkeit und Langzeitstabilität der erhaltenen Signale, die möglichst nicht durch interferierende Substanzen in den Probenflüssigkeiten beeinflusst werden sollen. Deshalb gibt es Untersuchungen zur ständigen Verbesserung solcher Elektroden hinsichtlich des Herstellungsprozesses sowie einer erleichterten Kommunikation zwischen dem verwendeten Enzym und der Elektrodenoberfläche. Als praxistaugliche und kostengünstige Möglichkeit der Elektrodenherstellung in großen Stückzahlen hat sich die Siebdrucktechnik erwiesen. Bei labortechnischen Untersuchungen konnte für bestimmte Enzyme, wie z.B. die Peroxidase aus Meerrettich, auch eine direkte elektrische Verbindung mit ausgewählten Elektrodenmaterialien dargestellt werden [3, 4]. Dieser direkte Elektronentransfer kann in seinem Umfang durch polymere Additive beeinflusst werden [5, 6], welche auch zu einer Stabilisierung der eingesetzten Enzyme beitragen können [7, 8]. Diese Effekte sind jedoch - auf molekularer Ebene - noch unverstanden und nur phänomenologisch erforscht.

Vorstellbar ist ein amperometrischer Sensor, der seine Spezifität durch ein immobilisiertes Enzym erhält, und aufgrund einer durch Additive optimierten Mikroumgebung des Enzyms ein ausreichend hohes und stabiles Meßsignal liefert. Zur Detektion von direktem Elektronentransfer ist weiterhin ein relativ niedriges Potential an der Elektrode erforderlich, was den Einfluß von potentiell interferierenden Substanzen minimiert.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von Enzymelektroden unter Ausnutzung des direkten Elektronentransfers von der Peroxidase aus Meerrettich (engl.: Horseradish Peroxidase, HRP) auf Dickschicht-Elektroden. Die Resultate mit nativer (glykosilierter) und rekombinant hergestellter (unglykosilierter) Peroxidase sollten den Einfluß auf den direkten Elektronentransfer von diesem Protein zur Elektrode zeigen. Durch den Vergleich

experimenteller Daten mit begleitenden Modellrechnungen in der Abteilung Strukturforschung der GBF sollte das Verständnis der ablaufenden Vorgänge auf molekularer Ebene verbessert werden. Mit diesen Modellrechnungen sollten Vorstellungen über die Spezifität und Orientierung der Wechselwirkungen von Proteinen mit Additiven bzw. Oberflächen entwickelt sowie Voraussagen über die resultierenden Elektronentransferraten vom Enzym zur Elektrodenoberfläche ermöglicht werden. Aus diesem Grund wurde die Peroxidase aus Meerrettich ausgewählt, da seit neuestem ihre dreidimensionale Struktur bekannt ist [9] und dadurch Computersimulationen mit diesem Enzym, für das direkter Elektronentransfer in der Vergangenheit prinzipiell nachgewiesen werden konnte, möglich sind. Darüber hinaus ist dieses Enzym in der biochemischen Analytik äußerst relevant [10].

Weiterhin waren Untersuchungen zum Einsatz von Analysesystemen mit Enzymelektroden das Ziel, wobei die Regelung der Mediumzufuhr bei kontinuierlichen Kultivierungen von tierischen Zellen durch automatisierte Glukosemessungen realisiert werden sollte. Die hier verwendeten Enzymelektroden beruhten auf dem klassischen Nachweis von Wasserstoffperoxid als dem Reaktionsprodukt der immobilisierten Glukoseoxidase (GOD).

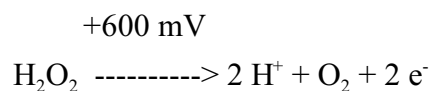
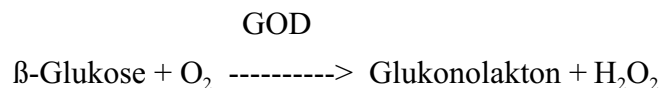
Die experimentellen Untersuchungen wurden im Bereich Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung m.b.H. (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Die Arbeiten zum Thema direkter Elektronentransfer sind Bestandteil des DIAMONDS-Projektes des Biotechnologie-Programms der Europäischen Union (Nr. BIO4-CT97-2199).

2 GRUNDLAGEN

2.1 Enzyme in der biochemischen Analytik mit amperometrischen Sensoren

2.1.1 Einsatz von Oxidasen

Enorme Bedeutung in der biochemischen Analytik und medizinischen Diagnostik haben die Oxidasen erlangt. Deren gemeinsames Produkt bei Substratumsatz ist Wasserstoffperoxid, das leicht elektrochemisch durch Oxidation an einer Platinanode nachgewiesen werden kann [11]. Die folgenden Reaktionsgleichungen zeigen dies beispielhaft für den Umsatz von Glukose durch das Enzym Glukoseoxidase (GOD):



Der resultierende Stromfluß beim elektrochemischen Umsatz von Wasserstoffperoxid verhält sich direkt proportional zur Konzentration des Edukts - hier Glukose - der enzymatischen Reaktion, sofern die Eduktkonzentration im linearen Bereich der enzymatischen Reaktion angesiedelt ist. Die Quantifizierung des eigentlichen Analyten ist so auf indirektem Weg möglich. Einsetzbar sind bei einer solchen Messung auch sogenannte Mediatoren als Elektronenüberträger zur Elektrode, die vom Enzym statt Sauerstoff als Elektronenakzeptor in die Reaktion eingebunden werden.

Neben Glukoseoxidase [12, 13] sind weiterhin die Enzyme Laktatoxidase (Laktatbestimmung im Blut [14, 15]) und Alkoholoxidase (Alkoholbestimmung in Spirituosen [16]) von praktischer Relevanz.

2.1.2 Direkter Elektronentransfer

Amperometrische Enzymsensoren, bei denen das Edukt oder Produkt der Katalyse detektiert wird, bezeichnet man als Elektroden der ersten, solche mit Verwendung von Mediatoren als Elektroden der zweiten Generation [17, 18].

Gegenwärtig fokussieren sich die Forschungsaktivitäten auf die Entwicklung enzymatischer Sensoren der dritten Generation. Deren Kennzeichen ist eine elektrische Verbindung von der

mit einem geeigneten Arbeitspotential polarisierten Elektrodenoberfläche zum aktiven Zentrum des Enzyms, wobei der Zusatz eines elektronentransportierenden Moleküls nicht erforderlich ist. So werden Oxidasen während der enzymatischen Katalyse oxidiert und müssen wieder reduziert werden, um einem erneuten Reaktionszyklus zur Verfügung zu stehen. Die zur Reduktion erforderlichen Elektronen werden bei einem Sensor der dritten Generation von der Elektrode geliefert, der resultierende Stromfluß kann theoretisch ebenso detektiert werden wie derjenige bei der Redoxreaktion einer niedermolekularen Verbindung. Vorteil dieser Vorgehensweise ist unter anderem die Verwendung eines relativ niedrigen Potentials, wodurch Interferenzen durch Störsubstanzen minimiert werden.

Zur Schaffung eines elektrischen Kontaktes zwischen Elektrodenoberfläche und einer Oxidase ohne die ständige Zuführung zusätzlicher Komponenten gibt es verschiedene Möglichkeiten [19, 20]. Zunächst bietet sich die Verwendung von hochmolekularen Mediatoren an, die durch eine Dialysemembran mit entsprechender Ausschlußgrenze zurückgehalten werden. Des weiteren können Cofaktoren mit leitenden Spacern an der Elektrodenoberfläche fixiert werden und zusammen mit dem Polypeptid (Apoenzym) das katalytisch aktive, vollständige Enzym bilden (Holoenzym). Diese Enzyme werden dann kovalent miteinander verbunden (Crosslinking) und so immobilisiert, der Spacer ermöglicht die elektrische Kommunikation mit der Elektrode. Die Enzyme können auch in einem Redoxpolymer [21] oder in einem leitenden Polymer mit kovalent gebundenen Mediatoren eingebettet werden. Möglich ist auch die kovalente Immobilisierung von Enzymen und Mediatoren über Spacer in unmittelbarer Nähe der Elektrodenoberfläche [22].

Allen diesen Methoden ist gemeinsam, daß der Elektronenfluß über leitende Schichten oder fixierte Mediatoren stattfindet. Demgegenüber gibt es aber auch die Möglichkeit des direkten Elektronentransfers, bei dem die Elektronen direkt von der Elektrodenoberfläche zum Enzym gelangen [23]. Der Umfang des so resultierenden Stromflusses wird in erster Linie vom gewählten Potential der Arbeitselektrode sowie von der Distanz des aktiven Zentrums des Enzyms von der Elektrodenoberfläche bestimmt [Marcus-Theorem, 24]. Der direkte Elektronentransfer erreicht bei einem bestimmten Potential sein Maximum [5] und nimmt gemäß dem Marcus-Theorem in seinem Umfang mit zunehmender Entfernung exponentiell ab [25]. Elektronen vermögen innerhalb von Proteinen über Distanzen von 20-30 Å zu tunneln [26], was im Bereich der Größe der Peroxidase aus Meerettich liegt. Ein unmittelbarer Kontakt von Proteinoberfläche zur Elektrode ist daher erforderlich. Deshalb können auch nur Enzyme am direkten Elektronentransfer partizipieren, welche direkt an der Elektrodenoberfläche positioniert sind. Außerdem ist die Geschwindigkeit des direkten Elektronentransfers in der Regel viel geringer als die Regeneration des Enzyms durch einen Mediator [23]. Die Rückhaltung von nur adsorbierten Enzymen an einer Elektrode kann mittels einer

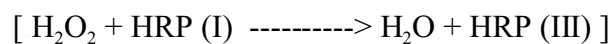
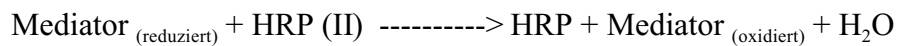
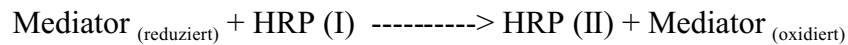
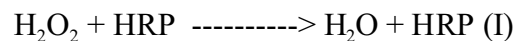
Dialysemembran erfolgen [27].

Um einen meßbaren direkten Elektronentransfer zu ermöglichen, muß der Abstand vom aktiven Zentrum zur Elektrodenoberfläche möglichst klein sein. Erschwert wird dies aber allein schon dadurch, daß in der Regel die aktiven Zentren weit innerhalb der Enzyme lokalisiert sind und die Elektronen schon innerhalb des Proteins eine relativ große Entfernung zurücklegen müssen [28]. In manchen Fällen kann es daher von Vorteil sein, durch eine gezielte Immobilisierung des Enzyms an bestimmten Aminosäureresten, die zu einer definierten Ausrichtung des Proteins relativ zur Elektrodenfläche führt, die Distanz zum aktiven Zentrum gering zu halten [29, 30]. Innerhalb eines Proteins sind bestimmte Elektronentransferwege favorisiert, kovalente Bindungen und Wasserstoffbrücken ermöglichen einen erheblich effektiveren Transfer als das umgebende Medium [31].

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der nativen, d.h. glykosilierten Peroxidase aus Meerrettich, auch die rekombinante Form dieses Enzyms eingesetzt. Diese sollte den Vorteil bieten, daß aufgrund der nicht vorhandenen Carbohydrathülle die Distanz vom aktiven Zentrum zur Elektrodenoberfläche geringer ausfällt. Die Folge wäre eine Steigerung der Stromausbeute, da die Reduktion des Enzyms als geschwindigkeitsbestimmender Schritt schneller erfolgen kann und somit das Enzym auch schneller einem erneuten Reaktionszyklus zur Verfügung steht.

2.1.3 Direkter Elektronentransfer mit Peroxidasen

Die Detektion von Wasserstoffperoxid als Reaktionsprodukt spezifischer Oxidasen ist in der biochemischen Analytik von großer Bedeutung. Zur Vermeidung des relativ hohen Potentials von ca. +600 mV (vs. Ag/AgCl-Referenz), das bei amperometrischen Messungen von Wasserstoffperoxid zur Oxidation angelegt werden muss, kann der Einsatz der Peroxidase aus Meerrettich (Horseradish Peroxidase: HRP) hilfreich sein, deren Substrate Peroxide, insbesondere Wasserstoffperoxid, sind [32]. Die Peroxidase wird bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid, das dabei selbst zu Wasser reduziert wird, oxidiert; in diesem Redoxzustand wird das Enzym als Compound I bezeichnet. Die Reduktion des Enzyms geht in einem zweistufigen Prozeß mit Compound II als Intermediärzustand vor sich [33], bei dem insgesamt zwei Elektronen übertragen werden. Die Reduktion kann entweder durch Elektronendonatoren (Mediatoren) wie Tetramethylbenzidin, Hydrochinon [34, 35], Ferrocen [36], Jodid, oder aber direkt durch die Elektrode erfolgen. Bei einer sehr hohen Konzentration an Wasserstoffperoxid kann sich in einem reversiblen Prozeß Compound III als die weiter oxidierte Form der HRP bilden, die katalytisch nicht mehr aktiv ist [37]. Das folgende Reaktionsschema verdeutlicht den Reaktionsweg bei einer Regeneration des Enzyms durch einen Mediator:



Detektiert wird an der entsprechend polarisierten Elektrode der oxidierte Mediator als Maß für die Enzymaktivität. Bei der Verwendung des Mediators Hydrochinon beispielsweise wird die oxidierte Form para-Benzochinon an der Elektrode nachgewiesen. Zwar kann im Vergleich zur Messung von Wasserstoffperoxid ein niedrigeres Potential angelegt werden, was den Beitrag interferierender Stoffe zum Signal mindert, nachteilig ist dennoch die Auswaschung eines solchen Stoffes in Fließsystemen. Außerdem sind Mediatoren meist toxisch.

Bei direktem Elektronentransfer erfolgt die Regeneration der HRP durch unmittelbare Übertragung der Elektronen von der Elektrodenoberfläche auf das Enzym (Abb. 2.1):

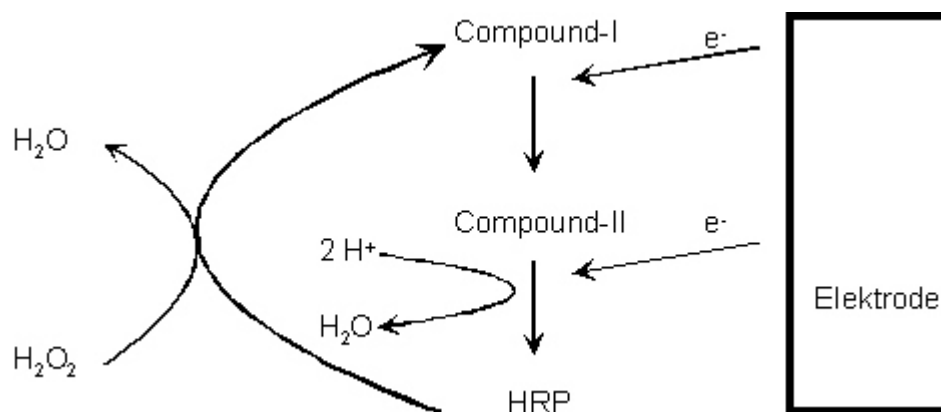


Abb. 2.1: Reaktionsschema des direkten Elektronentransfers (nach [23])

Dementsprechend sind bienzymatische Sensoren unter Schaffung einer Enzymkaskade mit beispielsweise Glukoseoxidase und einer Peroxidase beschrieben [38]. Im ersten Reaktionsschritt wird dann die Glukose als Analyt vom Enzym Glukoseoxidase umgesetzt, im zweiten Schritt wird das dabei entstandene Wasserstoffperoxid von der Peroxidase reduziert. Der sich durch direkten Elektronentransfer von der polarisierten Elektrode zur Peroxidase

ergebende Reduktionsstrom kann gemessen werden, wodurch eine Quantifizierung der Glukose ermöglicht wird.

Durch ihre Robustheit [39] sowie Preisgünstigkeit ist die HRP in der biochemischen Analytik als Markerenzym gekoppelt mit einem optischen Nachweis durch Verwendung von Farbstoffen als Elektronendonatoren [10] und zur amperometrischen Detektion von Peroxiden [40, 41] weit verbreitet. Ihre Reduktion an einer Graphit-Elektrode beginnt bei einem Potential unterhalb von +600 mV (vs. Ag/AgCl) und erreicht ihr Maximum bei etwa -100 mV [5, 23].

Der direkte Elektronentransfer von einer polarisierten Elektrode zur HRP konnte erstmals von Yaropolov et al. dargestellt werden [42]. Das eingesetzte Enzym befand sich dabei in Lösung, als Elektrodenmaterial diente sogenanntes "Carbon Black". Direkter Elektronentransfer kann durch die sukzessive Gabe von Enzymsubstrat, Wasserstoffperoxid im Falle der Peroxidase, herbeigeführt werden. Durch den Substratumsatz wird das Enzym oxidiert, die Elektronenaufnahme zur Reduktion der Peroxidase an der polarisierten Elektrode führt zu einem meßbaren Stromfluß. Im linearen Bereich des Enzyms wird der gemessene Stromfluß bei Substratzugabe gleichmäßig ansteigen, um bei Erreichen des Sättigungsbereiches nicht oder nur noch geringfügig zuzunehmen (in Abbildung 3.2 ist eine solche Messung gezeigt, aufgetragen ist die gemessene Stromstärke in Abhängigkeit von der Zugabe des Substrats H_2O_2).

Kommerzielle bienzymatische Sensoren unter Ausnutzung des direkten Elektronentransfers sind noch nicht erhältlich, der Hauptgrund dafür ist der im Vergleich zum Mediatoreinsatz geringe Stromfluß. Die Reduktion der HRP durch direkten Elektronentransfer geht im Vergleich zur Regeneration durch einen Mediator tatsächlich um etwa zwei Größenordnungen langsamer vor sich [23]. Die erzielten Stromstärken bei amperometrischen Messungen sind daher viel geringer, was die beschriebenen Vorteile relativiert. Eine gute Übersicht mit vertiefter Diskussion zum Thema amperometrische Sensoren auf der Basis direkten Elektronentransfers gibt [24].

2.1.4 Enzymstabilität

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung enzymatischer Meßmethoden ist die Stabilität des jeweils verwendeten Proteins. Enzyme unterliegen mehreren Einflüssen, die die katalytische Funktion beeinträchtigen und zur Denaturierung führen können. So liegen gelöste Enzyme in verschiedenen Konformationen vor, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Je höher die Umgebungstemperatur ist, desto stärker ist die Beweglichkeit der einzelnen Domänen eines Proteins und des umgebenden Mediums, der Verlust der Quartär- bzw. Tertiärstruktur wird begünstigt. In der Folge faltet sich das Protein auf und denaturiert [43]. Eine Rückfaltung in die native Konformation ist in der Regel nicht mehr möglich, der Verlust der enzymatischen Aktivität irreversibel [44]. Aus diesem Grund werden Enzymlösungen meist kühl aufbewahrt

oder sogar lyophilisiert eingefroren. Neben Temperatureinflüssen kann die Reaktion mit freien Radikalen oder der oxidative Angriff durch Sauerstoff und insbesondere Wasserstoffperoxid ein Enzym schädigen [45]. Zum Schutz vor mikrobiellem Befall werden Enzymlösungen häufig Antibiotika zugegeben [46].

Darüber hinaus begünstigen bestimmte Additive bei manchen Enzymen individuell die Stabilität, wobei die Mechanismen nicht immer im Detail aufgeklärt sind [47, 48, 49]. Sowohl die Aktivität als auch der lineare Bereich eines Proteins hinsichtlich der Umsetzung seines Substrates kann sich durch den Zusatz von Additiven ändern [50]. Die Immobilisierung von Enzymen an geeigneten Oberflächen durch Kopplung [51, 52] oder in Polymeren [53] sowie Silikaten [54] durch Einschluß kann ebenfalls stabilisierend wirken, indem die 3-D-Struktur gefestigt wird. Außerdem hat eine Immobilisierung den großen Vorteil, daß die Enzyme während einer Messung zurückgehalten werden und, beispielsweise in einer Enzymkartusche, für weitere Messungen erneut zur Verfügung stehen. Gegenstand der Forschung ist außerdem der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren in der Polypeptidkette durch gentechnische Methoden, die dann rekombinant hergestellten Proteine sind häufig stabiler [55].

Unterscheiden muß man bei enzymatischen Meßsystemen zwischen Arbeits- und Lagerstabilität. Als Arbeitstabilität wird das Verhalten des Sensors während Messungen charakterisiert. Bei Sensoren im Dauereinsatz spricht man von der Standzeit als den Zeitraum, in dem der Sensor befriedigende Signale liefert und eingesetzt werden kann. Dagegen bezeichnet die Lagerstabilität das Verhalten eines Sensors während seiner Lagerung, insbesondere nach der Herstellung bis zum ersten Einsatz.

Bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Dickschicht-Elektroden zur Bioprozessregelung handelt es sich um Sensoren, die mit einer Enzymmembran beschichtet sind. Diese besteht aus einer ausgehärteten Paste, in die zuvor die zu fixierenden Enzyme eingemischt wurden. Eine andere Möglichkeit der Fixierung wurde durch das Überdrucken einer trockenen Enzymschicht mit dieser Paste mit anschließender Aushärtung angewandt. Da diese Sensoren in Flüssigkeiten eingesetzt werden und in Fließinjektions-Analyse-Systemen dauernder Beanspruchung durch den jeweiligen Volumenstrom unterliegen, erscheinen als stabilisierende Additive zunächst solche als sinnvoll, die aufgrund ihrer Größe nicht aus der Membran ausgewaschen werden können. Hier bieten sich Polymere an, die in unterschiedlichen Verzweigungsgraden und Längen erhalten werden können. Bei Polymeren, die geladene Gruppen besitzen, wird durch die Wechselwirkung mit entsprechend polarisierten Aminosäureresten auf der Proteinoberfläche vermutet, daß eine Einhüllung des Enzyms durch das Polymer resultieren kann. Die Folge wäre ein erschwertes Auffalten und daher eine erhöhte Stabilität (Paketschnureffekt). Deshalb wurden hier hauptsächlich geladenen Polymere auf ihre Eignung zur Stabilisierung von HRP und GOD untersucht.

2.2 Elektrochemische Meßmethoden

2.2.1 Amperometrie

Bei der Amperometrie wird eine Arbeitselektrodenfläche in Lösung mit einem bestimmten Potential polarisiert, das die Redoxreaktion eines gewünschten Analyten an dieser ermöglicht [56]. Die reagierende Substanz wird Depolarisator genannt und an der Elektrode entweder durch Aufnahme von Elektronen reduziert (kathodischer oder Reduktionsstrom) oder durch Abgabe von Elektronen oxidiert (anodischer oder Oxidationsstrom) [57]. Der auftretende Stromfluß wird vom Potentiostaten, der auch die Arbeitselektrode polarisiert, gemessen und dient zur Quantifizierung des reagierenden Analyten. Das an eine Arbeitselektrode aufgeschaltete Potential wird relativ zu einer Bezugselektrode definiert, der Wert der Normal-Wasserstoffelektrode wurde willkürlich mit 0 festgelegt. Experimentell lassen sich diese Werte allerdings nicht immer exakt verifizieren, da kinetische Hemmungen der gleichgewichtseinstellenden Reaktionen oder unerwünschte Nebenreaktionen auftreten können [57]. Gängig sind Messungen mit einer Silber/Silberchlorid(Ag/AgCl)-Glaselektrode, deren Potential bezogen auf die Normalwasserstoffelektrode +0,1958 V (mit gesättigter KCl-Lösung gefüllt, [58]) beträgt.

Elektrochemisch messen kann man grundsätzlich in einem Zwei-Elektroden-System aus Arbeits- und Bezugselektrode. Da die resultierenden Ströme aber notwendigerweise dann über die Bezugselektrode abgeleitet werden, kann sich deren (Referenz-)Potential - bei höheren Stromflüssen - durch das Auftreten einer Überspannung ändern, sie wird dann als Potentialbezugspunkt unbrauchbar. Deshalb empfiehlt sich das Arbeiten mit einem Drei-Elektroden-System, in dem zusätzlich eine weitere Hilfselektrode (auch: Gegenelektrode) als Ableitelement eingefügt ist, so daß die Bezugselektrode keiner Strombelastung unterliegt [57]. Die Reduktion bzw. Oxidation einer elektrochemisch aktiven Substanz erfordert an einer Elektrode ein bestimmtes Potential (Arbeitspotential). Dieses muß unter bzw. über dem Normalpotential des Depolarisators liegen, um die Redoxreaktion zu ermöglichen. Zu Beginn einer amperometrischen Messung wird generell erst ein relativ hoher Stromfluß gemessen, der in einigen Sekunden oder Minuten auf ein konstantes Niveau abfällt. Dies ist begründet in der Einstellung eines stationären Gleichgewichts zwischen Stofftransport und elektrochemischer Reaktion an der Elektrode, bis die Konzentrationsverläufe in der Diffusionsgrenzschicht sich zeitlich nicht mehr verändern. Die an einer Elektrode umgesetzte Masse eines Stoffes ist der ausgetauschten Ladungsmenge proportional. Nach den Faradayschen Gesetzen [58] ist die Masse der abreagierten Spezies bestimmbar, wenn die geflossene Ladungsmenge, ihr elektrochemisches Äquivalent sowie ihr Molekulargewicht bekannt ist:

$$Q = n * z * F$$

Q: Ladungsmenge [C]

n: Stoffmenge

z: elektrochemisches Äquivalent

F: Faraday-Konstante (96485 [A*s*mol⁻¹])

Die Ladungsmenge ist gleich der (durch Messung erfaßbaren) Stromstärke multipliziert mit der Zeitdauer:

$$Q = I * t$$

I: Stromstärke [A]

t: Zeit [s]

Bestimmte Materialien eignen sich besonders für die elektrochemische Umsetzung eines bestimmten Stoffes, da sie katalytische Eigenschaften haben [56]. Als günstig für die Oxidation von Wasserstoffperoxid hat sich Platin erwiesen [11]. Aufgrund von irreversiblen Oberflächenprozessen wie Auswaschung, Vergiftung durch Metallionen sowie Ablagerungen von Metalloxiden (Passivierung) [58] kann eine Arbeitselektrode einer zunehmenden Verschlechterung ihrer Eigenschaften unterliegen (Fouling). Dies kann durch geeignete Elektrodenmaterialien oder auch Beschichtungen vermieden werden.

2.2.2 Zyklische Voltametrie

Die Erfassung der Stromstärke bei zeitlich kontinuierlicher Änderung des Potentials führt zur Aufnahme einer Strom-Spannungskurve. Bei stetiger Modulation des Potentials nicht nur in einer Richtung, sondern auch Aufnahme der Stromstärke bei gegenläufiger Änderung nach Erreichen des Umkehrpotentials hin zum Ausgangspotential erhält man ein zyklisches Voltamogramm (engl.: Cyclo-Voltammetry, abgekürzt: CV). Aus diesem lassen sich kinetische Daten der an der Elektrodenoberfläche ablaufenden Redoxreaktionen gewinnen, in der Regel mißt man bei dieser Methode mit einem Drei-Elektroden-System [57].

Bei Anwesenheit einer elektrochemisch aktiven Spezies werden den Deckschichtströmen die durch die entsprechenden Elektrodenreaktionen auftretenden Ströme überlagert (siehe Abb. 2.2). Bei einem ausreichend schnellen Potentialdurchlauf bildet sich im zyklischen Voltamogramm nach dem Erreichen des Reaktionspotentials der elektrochemisch aktiven Substanz ein Strommaximum (auch: Stromwelle) aus. Dieses entsteht dadurch, daß nach Erreichen dieses Potentials die Diffusionsschicht infolge der Reaktion an diesem Stoff verarmt und dessen Konzentration bei zunehmender Ausdehnung der Diffusionsschicht stetig sinkt.

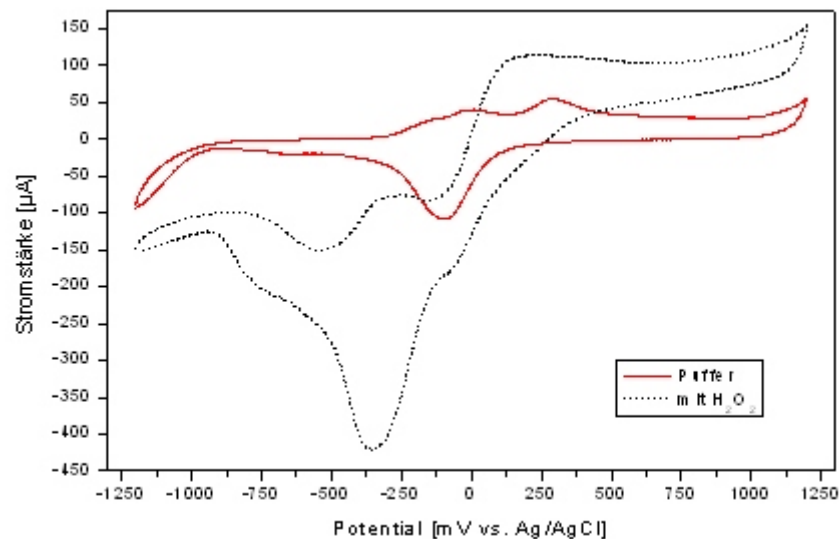


Abb. 2.2: Beispiel für zyklische Voltametrie (Messung mit einer Pt-DS-Elektrode in KPi-Puffer sowie nach Zugabe von H_2O_2 ; 100 mV/s, 5. Scan)

Unterschieden werden Reaktionen mit ungehemmtem (auch: reversiblen) und gehemmtem Ladungsdurchtritt. Während bei Reaktionen ersteren Typs das Strommaximum hinsichtlich des Potentials festliegt, ist seine Lage bei Reaktionen mit gehemmtem Ladungsdurchtritt abhängig von der Geschwindigkeit des Potentialdurchlaufs. Bei gehemmter Entladung stellen sich die Konzentrationen an der Elektrodenfläche langsamer ein als bei ungehemmtem Ladungsdurchtritt, demzufolge verschiebt sich das Strommaximum. Die Verschiebung wird bei Erhöhung der Geschwindigkeit des Potentialdurchlaufs (auch: Scangeschwindigkeit) verstärkt, weshalb sich ihre Modulation mit Aufnahme der Maximaverschiebung sehr gut als Diagnosekriterium zur Unterscheidung beider Fälle eignet.

2.2.3 Dickschicht-Technik

Im Siebdruck können in prinzipiell frei wählbaren Layouts Strukturen auf planare Oberflächen gedruckt werden. Dieses Verfahren wird in der Elektrotechnik eingesetzt, um elektrische Schaltungen zu erzeugen, wobei Toleranzen von $\pm 20\%$ aufgrund des Herstellungsprozesses üblich sind. Durch Lasertrimmen können sie allerdings in ihren Eigenschaften vereinheitlicht werden [59]. Die im Siebdruck erzeugten Schichtdicken bewegen sich größenordnungsmäßig um $10\text{ }\mu\text{m}$, die im Vergleich dazu in technisch sehr anspruchsvollen und kostenaufwendigen Bedampfungsprozessen hergestellten Dünnschichten weisen Dicken im Nanometer-Bereich auf. Beim Siebdruck wird eine je nach Verwendungszweck ausgewählte Paste mit einem Rakel

durch ein Sieb auf eine Oberfläche gepreßt. Die Maschen des Siebes sind undurchlässig, nur im gewünschten Layout sind sie offen und ermöglichen so den Druck einer definierten Struktur. Die Dicke der gedruckten Schicht hängt im wesentlichen ab vom sogenannten Absprung, der die Entfernung vom Sieb zur zu bedruckenden Oberfläche angibt, sowie der Viskosität der Druckpaste. Außerdem beeinflussen die Rakelgeschwindigkeit und Rakelhärte sowie die Maschenweite, das Siebmaterial, Bspannungsdruck und -winkel des Siebes die Schichtdicke. Nach dem Druckvorgang werden die planaren Träger getrocknet und die Pasten in einem bestimmten Temperaturprofil fixiert [60].

Leitende Schichten aus Platin-, Gold-, Silber/Palladium- oder Graphitpasten auf hitzeresistenten, nichtleitenden Keramiken können zur Erzeugung von Elektrodenflächen für Redoxreaktionen in Flüssigkeiten verwandt werden [59]. Durch den nachträglichen Aufdruck einer Enzyme enthaltenden Paste kann eine Elektrodenfläche mit einer Enzymmembran versehen werden [59, 61]. Eine solche Dickschicht-Enzymelektrode kann in einem Fließinjektions-Analysesystem als amperometrischer Detektor Verwendung finden [62, 63]. Die rationelle Fertigung von planaren Enzymsensoren in großen Stückzahlen ist mit diesem Verfahren möglich [64].

Die hier eingesetzten Dickschicht-Elektroden (Abb. 2.3) konnten in passende Fließzellen aus Plexiglas eingesetzt werden, mit entsprechenden Adaptern war der elektrische Anschluß zu den jeweils verwendeten Potentiostaten gewährleistet. Mit den Platinelektroden im Doppellayout lagen bereits Erfahrungen hinsichtlich Fermentationsanalytik vor [65]. Während auf der einen Arbeitselektrode das Enzym Glukoseoxidase oder Laktatoxidase immobilisiert wird, ist die zweite Membran enzymfrei. Im Einsatz zur Detektion des jeweils gewünschten Analyten Glukose oder Laktat wird dann an der Platinelektrodenfläche mit dem Enzym ein Stromfluß registriert, der sich zusammensetzt aus der elektrochemischen Umsetzung des Wasserstoffperoxids (als enzyspezifischem Reaktionsprodukt der jeweiligen Oxidase) sowie elektrochemisch aktiven Substanzen wie beispielsweise Ascorbinsäure, sogenannten interferierenden Substanzen. Letztere sollten an der zweiten Elektrodenfläche ebenfalls reagieren, durch Differenzmessung kann dann die Höhe des enzyspezifischen Signals ermittelt werden. Die Membranen werden bei diesen Elektroden hergestellt, indem die gewünschten Enzyme (mit eventuellen Additiven) in eine spezielle Paste eingemischt werden. Diese wird dann im Siebdruck auf die Elektrodenflächen aufgebracht und durch kurze Belichtung mit UV-Strahlung einer bestimmten Wellenlänge ausgehärtet.

Die Graphitpaste Elektrodag 421-SS hatte sich in einer früheren Arbeit zur Herstellung von Elektroden als geeignet erwiesen, mit denen das Enzym Peroxidase durch Reduktion des oxidierten Mediators para-Benzochinon nachgewiesen werden konnte [62]. Graphitpasten haben neben ihrer im Vergleich zu Platin- und Goldpasten niedrigen Kosten auch den Vorteil, daß sie

nicht bei hohen Temperaturen gebrannt werden müssen. Ihr Einsatz zur Erfassung direkten Elektronentransfers ist auch vorteilhaft, weil sie reaktionsträger hinsichtlich der Umsetzung von H_2O_2 sind. Vorstellbar ist weiterhin die künftige Entwicklung von (Graphit-) Pasten, die bereits Enzyme als spezifische Biokatalysatoren enthalten und bis zum Druckvorgang konfektioniert bevorratet werden können. Dies setzt allerdings eine hohe Lagerstabilität der Enzyme - und der Paste als Immobilisierungsmatrix - voraus. Die in dieser Arbeit verwendeten Dickschicht-Sensoren sind im Material- und Methodenteil spezifiziert. Alle drei Layouts sind für eine Massenfertigung geeignet; die GBF-Sensoren wurden selbst hergestellt, die Trace-Sensoren vom Projektpartner Trace (Braunschweig) bezogen.

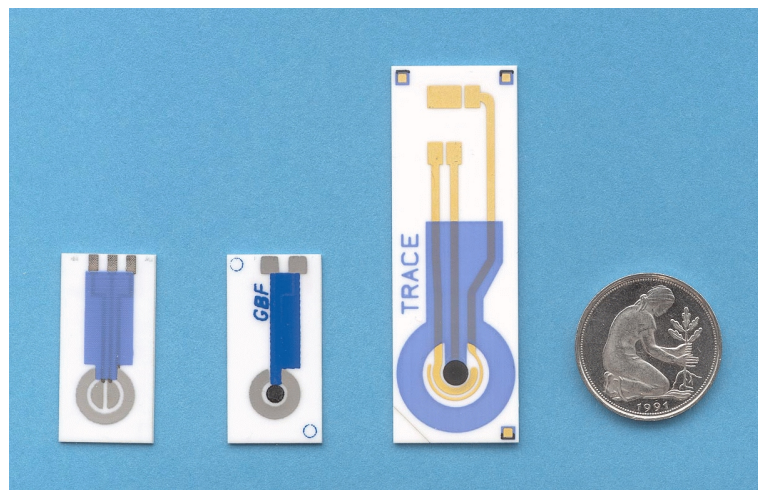


Abb. 2.3: Verwendete Dickschicht-Elektroden, von links nach rechts:

- Doppel-Arbeitselektroden-Layout, Platin (GBF)
- Einfach-Arbeitselektroden-Layout, Graphit (Elektrodag 421-SS) auf Gold (GBF)
- Einfach-Arbeitselektroden-Layout, Graphit (Elektrodag 423-SS) auf Gold (Trace)
- (50-Pf.-Münze zum Größenvergleich)

2.3 Bioprozesstechnik

Ziel von Fermentationen ist die Gewinnung von Zellprodukten wie Zitronensäure (*Aspergillus niger*) oder Pharmaproteinen (bestimmte Säugerzelllinien, *Escherichia coli*) oder auch der Zellmasse an sich (z.B. HeLa-Zellen). Unterschieden werden absatzweise durchgeführte Fermentationen (Batch) sowie kontinuierliche (mit Zellrückhaltung), bei denen ständig frisches Nährmedium zugeführt und verbrauchtes Medium abgeführt wird. Wird nach bestimmten

Zeiträumen der Bioreaktor teilweise geleert und mit frischem Medium aufgefüllt, spricht man von fed-Batch Kultivierung. Ein Mangel an Nährstoffen führt zunächst zu verlangsamtem Wachstum und folgend zum Zelltod.

2.3.1 Bioprozessanalytik

Die Kultivierung von Bakterien, Pilzen und insbesondere tierischen Zellen in Bioreaktoren erfordert eine aufwendige Meß- und Regeltechnik [66, 67]. Zur Aufrechterhaltung des mikroorganismenspezifischen Milieus beispielsweise hinsichtlich Betriebstemperatur, Wasserstoffionenkonzentration, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck ist eine ständige Erfassung dieser Größen mit nachgeschalteten Regelungseinrichtungen notwendig. Die zuverlässige Messwertaufnahme dieser Größen ist Stand der Technik. Weiterhin müssen Parameter wie der Glukosegehalt als Ausdruck des physiologischen Zustandes der kultivierten Zellen kontrolliert und beeinflusst werden können. Die Erfassung des Glukosegehaltes bedingt zur Zeit allerdings die manuelle Probenahme mit anschließender off-line Analytik.

2.3.2 Fließinjektions-Analyse (FIA)

Das Prinzip der Fließinjektions-Analyse (FIA) wurde 1975 von Ruzicka und Hansen gerätetechnisch verwirklicht [68]. Bei dieser Technik wird ein definiertes Flüssigkeitsvolumen reproduzierbar in einen nicht-segmentierten, bewegten Trägerstrom eingebracht und in einem engvolumigem Schlauchsystem durch einen Detektor gepumpt. Dieser erfaßt einen bestimmten physikalischen Parameter wie Oxidations- oder Reduktionsstrom, Leitfähigkeit, Absorption oder Fluoreszenz. Der im Normalfall kontinuierlich durch den Detektor fließende Trägerstrom erzeugt ein gleichförmiges Signal (Basislinie), nur bei Injektion einer Probenflüssigkeit ändert sich die Signalthöhe. Das injizierte Flüssigkeitssegment erfährt im Fließsystem eine charakteristische Verdünnung (Dispersion), die im parabolischen Geschwindigkeitsprofil einer bewegten Flüssigkeit über den Schlauchquerschnitt begründet ist [69]. Aus diesem Grund ergibt sich im Detektor ein Signal in Form eines Peaks (Abb. 2.4). Zur Quantifizierung wird normalerweise die Höhe des Peaks herangezogen, jedoch kann auch die Fläche ausgewertet werden [68].

In der Regel sind FIA-Apparaturen modular aus Pumpen, Ventilen und Detektoren aufgebaut sowie eventuell mit weiteren Einbauten wie Luftblasenfallen, Verzweigungen, Mischkammern oder auch Enzymkartuschen versehen. Dies ermöglicht eine hohe Variabilität bei der Konzeption eines Fließinjektions-Analyse-Systems, auch aufwendige Fließsysteme können für spezielle Anforderungen realisiert werden.

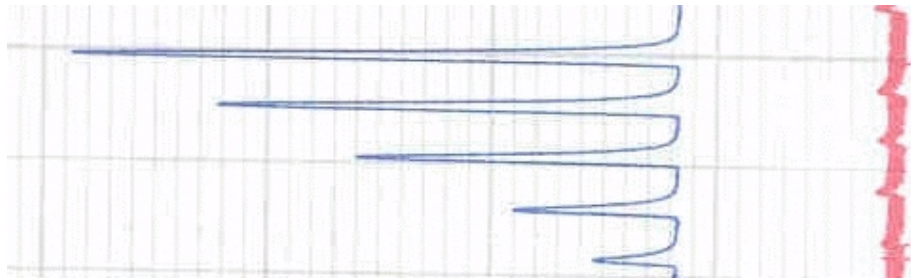


Abb. 2.4: Typisches Aussehen von Peaks im Meßprotokoll (dargestellt ist eine Kalibration mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen, rot: Blindwertsignale)

Die als Dispersion bezeichnete Verdünnung der injizierten Probe im System wird hauptsächlich durch die Innendurchmesser der Schläuche (0,3 - 0,8 mm), die Fließgeschwindigkeit (0,1 - 4,0 mL / min) und die Länge des Fließweges beeinflusst [69]. Als Maß für die Dispersion dient der Dispersionskoeffizient D , der als das Verhältnis von der Konzentration des Analyten in der Probe zur Konzentration im Detektor nach der erfolgten Verdünnung im Fließsystem definiert ist:

$$D = c_0 / c_{\max}$$

Der Dispersionskoeffizient ist eine wichtige Kenngröße der FIA-Technik, seine Kontrolle läßt die gezielte Auslegung von Analysesystemen zu. Der automatisierte Betrieb von FIA-Apparaturen durch angeschlossene Steuereinheiten bei gleichzeitiger Auswertung der Signale mittels entsprechender Software ist Stand der Technik [70]. Die Integration eines Biosensors - beispielsweise einer Enzymelektrode - als Detektionseinheit ist möglich. Gearbeitet wird in einem FIA-System unter kinetisch kontrollierten Bedingungen, sofern chemische oder biochemische Reaktionen ablaufen [68].

2.3.3 Bioprozessanalytik mit Fließinjektions-Analyse

Ein wichtiger Anspruch bei der Bioprozessanalytik und -regelung ist die Gewährleistung eines Abschlusses des Fermenterinhalt von der Außenwelt, um Kontaminationen zu vermeiden. Der Fermenter sowie die Schlauchperipherie müssen - wie auch die Meßsonden - autoklavierbar sein, um den Kultivierungsbehälter vor der Beimpfung mit den Zellen durch Heißdampf zu sterilisieren. Die Kultivierung eines bestimmten Zelltyps im Fermenter erfordert nach der Inokulation monoseptisches Arbeiten sowie eine unter sterilen Bedingungen durchführbare, reproduzierbare Probenahme. Die Probe muß ohne Zeitverzug vermessen werden können bzw.

die darin enthaltenen Zellen müssen inaktiviert werden, um eine Veränderung der Konzentrationen enthaltener Stoffe infolge andauernder Stoffwechselaktivität zu vermeiden. Eine Automatisierung nicht nur der Fermenterperipherie, sondern auch der Probenahme, der Datenerfassung und -prozessierung ermöglicht eine weitgehende Reproduzierbarkeit von Fermentationen und damit eine gleichbleibende Produktqualität. Darüber hinaus können Modellierungen besser überprüft und Stoffwechseluntersuchungen an den kultivierten Zellen durchgeführt werden [71]. Bei kontinuierlichen Kultivierungen stellt sich auch das Problem der Produktabtrennung, die parallel zur Fermentation erfolgen sollte.

Während physikalische Parameter wie der pH-Wert oder die Temperatur relativ problemlos mit in-situ sterilisierbaren Sonden aufgenommen werden können [66], ist die on-line Messung von physiologischen Parametern wie Glukose und Laktat mit Biosensoren möglich. Diese allerdings können nicht zusammen mit dem Kultivierungsbehälter vor Beginn der Fermentation autoklaviert werden, da die immobilisierten Enzyme durch die dabei auftretende Hitze inaktiviert würden. Dieses Problem könnte durch die Kopplung der Analyseapparatur an den Fermenter mit einem zwischengeschalteten, dampfsterilisierbaren Entnahmeventil umgangen werden. Auch sind prinzipiell Membranen mit einer entsprechenden Porengröße (auch: Cut-Off) geeignet, Probenflüssigkeit als Permeat passieren zu lassen, Keime jedoch nicht. Problematisch ist dabei, daß insbesondere bei der Kultivierung von tierischen Zellen diese Membranen durch die zahlreichen in der Kulturbrühe vorhandenen Proteine verblocken können [72].

Die Verwendung einer Fließinjektionsanalyse-Apparatur (FIA) mit integrierten Biosensoren als on-line Meßgerät zur Erfassung der Konzentrationen der wichtigsten Metabolite ist eine geeignete Möglichkeit, den physiologischen Zustand der kultivierten Zellen zu kontrollieren [73]. Einerseits kann mit amperometrischen Sensoren unter Einsatz von substratspezifischen Oxidasen die Abnahme von Sauerstoff in der zu vermessenden Probe als Maß für die Konzentration des Analyten herangezogen werden [74], zum anderen die Zunahme von Wasserstoffperoxid als Reaktionsprodukt [11].

Die in dieser Arbeit eingesetzte Fließinjektions-Analyse-Apparatur (FIA) zur Analytik bei kontinuierlichen Kultivierungen tierischer Zellen mit Zellrückhaltung enthielt mehrere Diffusionszellen mit Dialysemembranen, durch die niedermolekulare Analyte vom Trägerstrom in insgesamt drei Akzeptorströme eintreten konnten. Diese Akzeptorströme wurden folgend durch drei Detektionszellen geleitet, die Dickschicht-Elektroden mit GOD- bzw. LOD-Membranen enthielten und zur elektrochemischen Detektion von Wasserstoffperoxid geeignet waren. Mit den aufgenommenen Stromstärken war so die indirekte Quantifizierung von Glukose bzw. Laktat in den Kulturbrühen nach Vermessung von Kalibrierlösungen möglich. Die Dialysezellen wurden zum einen eingesetzt, um die Analyte in mehrere Teilströme aufzuteilen und ein simultanes Vermessen mit allen Detektoren zu ermöglichen, zum anderen, um mögliche

Ablagerungen von höhermolekularen Inhaltsstoffen der Kulturbrühe auf den Enzymmembranen der Elektroden zu verhindern. Abbildung 2.5 zeigt zur Illustration die verwendete FIA bei der Bioprozesskontrolle tierischer Zellen im 100-Liter Fermenter. Im Material- und Methodenteil wird dieser Aufbau detailliert erläutert.

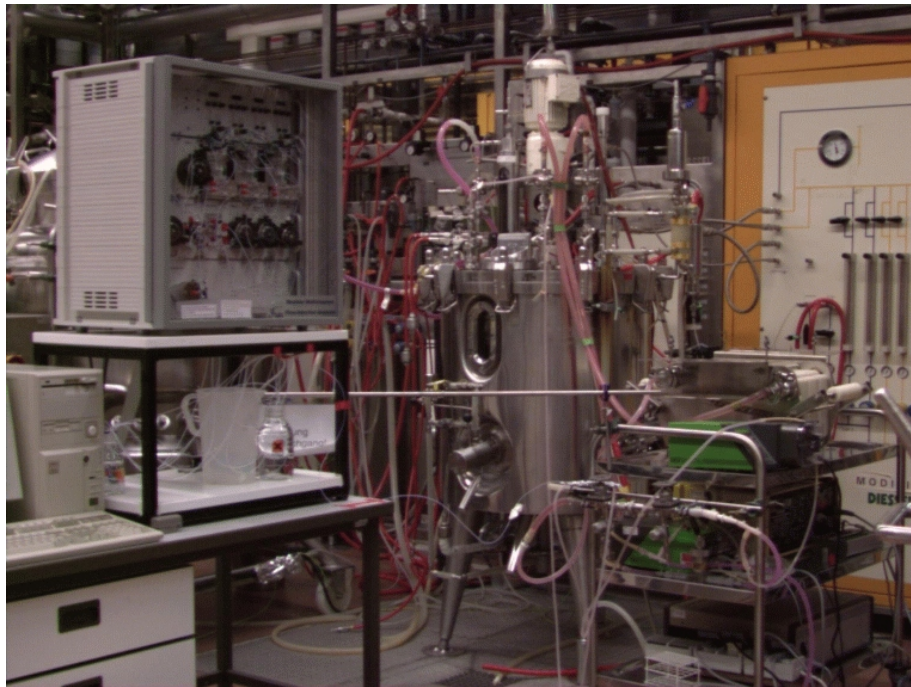


Abb. 2.5: Aufnahme des Fermentationsaufbaus während des Betriebes (FIA-Apparatur links, Fermenter mittig) [75]

2.3.4 Bioprozessregelung

Während einer Kultivierung von tierischen Zellen (oder auch Bakterien oder Pilzen) wird das umgebende Medium durch die Stoffwechselaktivitäten in seiner Zusammensetzung verändert. Insbesondere werden bestimmte Stoffe durch die - wachsenden - Zellen aufgenommen und verbraucht. Dabei handelt es sich nicht nur um Moleküle wie Aminosäuren, die zum Aufbau der zelleigenen Strukturen benötigt werden, sondern auch um solche, die den Zellen als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle, Vitamine und als Energielieferanten dienen. In der tierischen Zellkultur eingesetzte Medien enthalten Glukose als Energiequelle, weitere Bestandteile liegen dazu im Überschuß vor.

Bei der Bioprozessanalytik, die in der vorliegenden Arbeit betrieben wurde, war die Regelung des Glukosegehaltes im Fermenter das Ziel. Da durch die kultivierten Zellen ständig Mediumbestandteile verbraucht wurden, mußten diese nachgeliefert werden. Indikator für den Zustand des Mediums war der Gehalt an Glukose, der nicht unter den Wert 1,0 g/L fallen sollte; die übrigen Mediumbestandteile waren dann immer noch in ausreichendem Maße vorhanden. Bei den Kultivierungen tierischer Zellen wurde in Fermentern mit Zellrückhaltung gearbeitet, (verbrauchtes) Medium aus dem Fermenter konnte ständig entnommen und Frischmedium zugeführt werden. Die prinzipiell mögliche automatische Regelung der Fließrate dieses Prozesses aufgrund von ermittelten Glukose-Daten der an den Fermenter angeschlossenen FIA-Apparatur sollte die manuelle Eingabe von Fließraten ersetzen, bei der man sich auf die ein- bis zweimal am Tag durchgeführte off-line Analytik stützt und die jeweiligen Parameter nach Erfahrungswerten festsetzt. Die automatische Regelung ließ eine Mediumersparnis zusammen mit gleichmäßigen Bedingungen im Fermenter erwarten, da sie schneller auf Änderungen in der Kulturbühe reagiert. Realisiert wurde dies durch den Anschluß einer FIA-Apparatur, die den aktuellen Glukosegehalt im Medium mißt und an das übergeordnete Bioprozessleitsystem UBICON [76] übermittelt. Dieses enthält programmierte Regelroutinen und adaptiert dann die Fließrate der Perfusionspumpe, wodurch so der Glukosegehalt geregelt wird.

Unter regelungstechnischen Aspekten wird der angestrebte Glukosegehalt Sollwert und der tatsächlich zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene Glukosegehalt Istwert genannt, die Differenz bildet eine Regelabweichung. Unkontrollierte Ereignisse, die sich auf den Glukosegehalt auswirken, bezeichnet man als Störgrößen. Letztere werden in einem Fermenter durch die sich ändernde Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen wiedergegeben, die in sich veränderndem Umfang dem Medium Glukose entziehen. Wird kontrolliert frisches Medium in den Fermenter zugeleitet und verbrauchtes entnommen, so ist die Fließrate der Perfusionspumpe die Regelgröße.

Der Istwert wird zeitdiskret, d.h. in bestimmten zeitlichen Intervallen, ermittelt und prozessiert. Für das Antwortverhalten (Übergangsfunktion) des Reglers, hier also die an den ermittelten Glukosegehalt adaptierte Fließrate der Pumpe, gibt es mehrere Möglichkeiten (Abb. 2.6, nach [77], [78]). Ein Proportionalregler (P-Regler) gibt ein der Abweichung vom Sollwert proportionales Ausgangssignal ab, sein Kennzeichen ist eine bleibende Regelabweichung. Ein Integralregler (I-Regler) liefert ein dem zeitlichen Integral über der Regelabweichung proportionales Signal, während ein Differentialregler (D-Regler) ein zeitlich sehr kurzes, in der Höhe von der Änderungsgeschwindigkeit der Regelgröße abhängiges Antwortsignal liefert (nicht gezeigt).

Bei technischen Anwendungen mit Systemen, bei denen der Istwert nur in relativ großen Zeiträumen einer signifikanten Änderung unterliegt (wie bei einer kontinuierlichen Kultivierung

von Zellen), wird meist eine Kombination von Proportional- und Integralregler eingesetzt (PI-Regler).

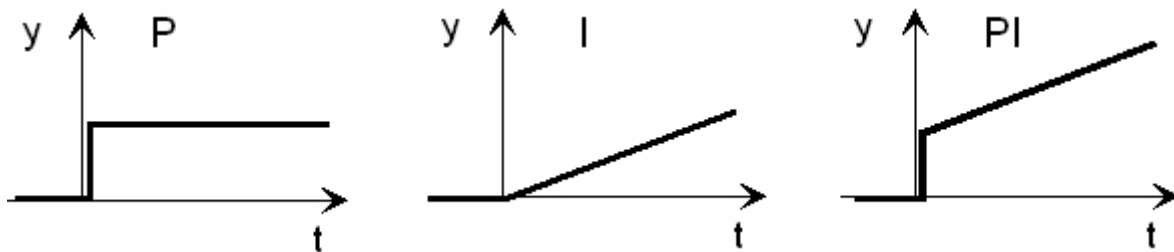


Abb. 2.6: Übergangsfunktionen von (jeweils idealem) Proportionalregler, Integralregler und Proportional-Integralelem Regler als Antwortverhalten auf eine (dauernde) Regelabweichung

Entscheidend für eine befriedigende Regelung ist die jeweils angepasste Höhe der Zahlenwerte für Proportional- und Integralbeiwert in der Regelungsgleichung. Zu niedrige Werte führen zu einem zu geringen Ausgangssignal des Reglers, zu hohe Werte bergen die Gefahr des Überschwingens der Regelgröße. Die zusätzliche Verwendung eines D-Anteils ist bei Anwendungen mit relativ langsamen Änderungen der Regelgröße nicht erforderlich.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Fa. Aldrich, Milwaukee, USA:	Citronensäure (Natrium-Salz, 99 %) Hydrochinon (99 %) Polyethylenimin (Molekulargewicht 2.000) Polylysin (Molekulargewicht 30.000 - 70.000)
Fa. Biochrom KG, Berlin:	FCS (fötales Kälberserum, Lot No. 417 L)
Fa. Boehringer, Mannheim:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
Fa. ISP, Guildford, Großbritannien:	Gafquat 755N
Fa. Merck, Darmstadt:	L(+)-Ascorbinsäure (reinst) Borsäure (p.a.) D(+)-Glukose (für biochemische Zwecke) Di-Kaliumhydrogenphosphat (p.a.) Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.) Natriumazid (reinst) Wasserstoffperoxid (30 %) Graphit, feinst
Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn:	DMSO (Dimethylsulfoxid)
Fa. Riedel de Haën, Seelze:	Kaliumchlorid (p.a.) Natriumacetat (wasserfrei) Schwefelsäure (p.a.)
Fa. Sigma, St. Louis, USA:	DEAE-Dextran (Chlorid-Salz, durchschnittliches Molekulargewicht 500.000) Dextran (aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , Stamm B-512, durchschnittliches Molekulargewicht 166.700) Dextran-Sulfat (Natrium-Salz, durchschnittliches Molekulargewicht 500.000) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) L-Laktat (Lithiumsalz) Natriumhydroxid (wasserfrei) para-Benzochinon (99 %) Rinderserum-Albumin (BSA, Fraktion V) Tris (r.g.); Tween 20

3.2 Enzyme

Zur Herstellung der Enzymelektroden für den Einsatz in der Bioprozesskontrolle wurde Glukoseoxidase (GOD) aus *Aspergillus niger* der Firma Sigma (Typ VII-S, St. Louis, USA) sowie Laktatoxidase (LOD) aus *Pediococcus species* der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet. Die eingesetzte native Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase, HRP_{nat}) stammte aus einer bestimmten Charge der Firma Biozyme (Gwent, Großbritannien), die von allen Partnern im DIAMONDS-Projekt bezogen wurde. Rekombinante Horseradish-Peroxidase (HRP_{rec}) wurde von I. Gazaryan (staatliche Universität Moskau) eingefroren in wäßriger Lösung erhalten. Es handelte sich um in Kultivierung von *Escherichia coli* rekombinant hergestelltes Enzym [79, 80], welches in seiner Aminosäure-Sequenz der nativen HRP entspricht, jedoch wegen der Synthese in einem Prokaryonten keine Glykosylierung aufweist. Die lyophilisierten Enzyme einschließlich der in Lösung aliquotierten rekombinanten HRP wurden bei minus 20°C gelagert.

Zur Deglykosylierung der nativen HRP und GOD wurde Endoglykosidase H (Boehringer, Mannheim) sowie α -Mannosidase (Boehringer, Mannheim) eingesetzt.

3.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen sämtlicher Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Flüssigkeiten, die in den FIA-Apparaturen eingesetzt wurden, wurden vorher durch angelegten Unterdruck entgast. Clark & Lubs - Puffer wurde hergestellt, indem 14,9 g Kaliumchlorid und 12,4 g Borsäure in zwei Litern Wasser gelöst wurden. 500 mL dieser Lösung wurden mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt, durch Zugabe eines geringen Volumens 1,0 M Natronlauge wurde der pH-Wert (stets pH 8,0) eingestellt. Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M) wurde durch Mischen von je 0,1 M Lösungen von Kaliumdihydrogenphosphat bzw. Di-Kaliumhydrogenphosphat hergestellt, wobei der pH-Wert durch das Mischungsverhältnis bestimmt wurde. Zur Herstellung von Natrium-Acetat-Puffer (0,1 M) wurde eine 0,1 M Natrium-Acetat-Lösung angesetzt, deren pH-Wert durch Zugabe von 1,0 M Citronensäure eingestellt wurde.

Kalibrierlösungen zur Bioprozessregelung wurde 0,05 % w/v Natriumazid beigegeben, um mikrobiellen Bewuchs zu verhindern. Dadurch blieben die Lösungen mehrere Tage verwendbar, die Elektrodensignale wurden indes nicht beeinflusst.

TMB-Lösung bestand aus einer Mischung von 25 ml Natriumacetat-Puffer, 100 μ L 1 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung sowie 400 μ L TMB-Stammlösung [6 mg TMB / 1 mL DMSO], welche unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur mehrere Wochen haltbar war. Die TMB-Lösung wurde erst unmittelbar vor der Benutzung hergestellt.

3.4 Verwendete Elektroden

3.4.1 Dickschicht-Elektroden

Von den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Dickschicht-Elektroden wurden einige selbst in der GBF hergestellt, andere von einem Projektpartner bezogen (Abb. 2.3).

In der Bioprozessanalytik kamen Dickschicht-Elektroden zum Einsatz, die im Siebdruckverfahren im Reinraum der GBF (Reinraumklasse 4) gefertigt wurden. Dabei wurde im Produktionsprozeß die halbautomatische, PC-unterstützte Druckmaschine Microtronic II (EKRA, Kirchheim) verwendet. Zunächst wurden die Leiterbahnen samt ringförmiger Referenzelektrode und folgend die zwei halbkreisförmigen Arbeitselektrodenflächen (Fläche je ca. 6,3 mm²) auf Aluminiumoxid-Keramiken höchster Qualität (Ceramtech, Hoechst, Frankfurt) gedruckt. Bei beiden Schritten wurde die Platinpaste 3804 von Ferro (New York, USA) verwendet. Nach jedem Druckvorgang wurden die Keramiken („Substrate“) für 15 Minuten bei Raumluft abgelegt, um ein Zusammenfließen der Pasten zu einer einheitlich dicken Schicht über das Siebmuster zu ermöglichen. Anschließend wurden die Keramiken für 15 Minuten in einem Trockenofen (120°C) vorgeheizt und dann in einem Brennofen (7354-M, BTU Eng. Corp., Großbritannien) mit einem bestimmten Hochtemperaturprofil gebrannt [61], bei dem zunächst die organischen Bestandteile verdampfen und anschließend die Versinterung der Platinbestandteile in der Glasschmelze stattfindet. Im letzten Druckschritt erfolgte das Aufbringen der Isolierschicht (ESL 240-SB, Reading, Großbritannien), die nach dem 15minütigen Ablegen bei Raumtemperatur durch 30 Minuten bei 120°C im Trockenofen (Heraeus, Karlsruhe) fixiert wurde.

Zur Herstellung von Dickschicht-Elektroden mit nur einer Arbeitselektrodenfläche zur Immobilisierung der HRP wurden Siebe mit einem ähnlichen Layout verwendet, bedruckt wurden die gleichen Keramiken. Die kreisförmige Arbeitselektrode (A: ca. 5,0 mm²) bestand hier allerdings aus der Goldpaste 5715 (DuPont, USA), welche mit demselben Temperaturprofil wie die Platinpaste gebrannt und in einem Folgeschritt mit Graphitpaste überdruckt werden konnte. Gewählt wurde die Graphitpaste Elektrodag 421-SS (Acheson, Plymouth, Großbritannien), die im Trockenofen bei 80°C (30 Minuten) fixiert wurde.

Im Rahmen der Aufgabenstellungen des DIAMONDS-Projekts wurde weiterhin mit Dickschicht-Elektroden eines Projektpartners gearbeitet, die ebenfalls mit einer kreisförmigen Arbeitselektrodenfläche versehen waren (Typ 850.100.118, Trace, Braunschweig). Diese bestand aus einer mit der Graphitpaste Elektrodag 423-SS (Acheson, Plymouth, Großbritannien) überdruckten Goldschicht. Das Layout unterschied sich von dem der in der GBF gefertigten Sensoren hauptsächlich durch die geometrischen Abmessungen der Arbeitselektrodenfläche (ca.

7,0 mm²). Die Leiterbahnen sowie die ringförmige Referenzelektrode bestanden bei diesen Elektroden aus Goldpasten.

Die Dicken der siebgedruckten Schichten konnten mit dem Lichtschnitt-Mikroskop der Firma Zeiss (Oberkochen) bestimmt werden.

3.4.2 Präparation der GOD- und LOD-Dickschicht-Sensoren

Die enzymatischen Sensoren wurden hergestellt, indem je 20 µL eines Gemisches aus Enzym und Additiven mit 35 mg einer UV-polymerisierbaren Paste auf Methylacrylat-Basis homogen verrührt wurde. Zur Glukose-Analytik bestand dieses aus 10 µL in Clark & Lubs-Puffer gelöster Glukoseoxidase [100 mg/mL] mit 5 µL BSA-Lösung [20 % w/v] und 5 µL Polylysin-Lösung [20 % w/v]. Für Laktatelektroden wurden 10 µL Laktatoxidase [100 mg/mL] mit 10 µL eines Additiv-Gemisches (5 µL DEAE-Dextran [20 % w/v] mit 10 µL Lactitol [50 % w/v]) durch Rühren mit einem Rührspatel vermischt. Die Beimengung der jeweiligen Additive diente zur Stabilisierung der Enzyme in den fertigen Sensoren, bei Variation der Zusätze wurde aber immer darauf geachtet, daß das Verhältnis von Pasteneinwaage zum Volumen der Lösung gleich war.

Die jeweiligen UV-Pastenmischungen (35 mg Paste mit 20 µL Enzym/Additiv - Lösung) wurden mit der manuell bedienbaren Druckmaschine HT 10 (Fleischle, Brackenheim) auf die Platin-Dickschicht-Elektroden gedruckt (wasserfestes Sieb aus Nylon, mit 22,5° diagonal bespannt, T100, Schichtaufbau 20µ; Farben-Frickell, Braunschweig). Durch Belichtung mit einer UV-Lampe wurde die Enzympaste in Sekunden gehärtet (Aktiprint-mini, Grävenwiesbach; Geschwindigkeitseinstellung des Laufbandes: 80 rpm). Die zweite Elektrode bei Verwendung des Doppellayouts war in einem vorhergehenden Schritt mit einer Pastenmischung bedruckt worden, die statt Enzym BSA derselben Menge enthielt. Auf diese Weise sollte eine Kontrollelektrode erhalten werden, die mit identischen Dispersionseigenschaften, jedoch ohne katalytische Aktivität zur Ermittlung des Blindwertes einer zu vermessenden Probe diente. Die fertigen Enzymsensoren wurden trocken bei 4°C aufbewahrt und blieben über Monate hinweg verwendungsfähig.

Abbildung 3.1 zeigt AFM(Atomic-Force-Microscopy)-Aufnahmen (Digital Instruments, Santa Barbara, USA) der unbeschichteten Platinoberfläche einer Dickschicht-Elektrode sowie die eines Sensors, der mit einer GOD-Membran beschichtet wurde. Bei der AFM-Technik wird die Oberfläche eines zu untersuchenden Objektes mit einer hochfeinen Spitze lateral abgetastet, eine Unebenheit verursacht deren Hub und infolgedessen die Ablenkung eines Laserstrahls. Aus den gesamten Ablenkungen über einem Flächensegment kann ein Abbild der Oberflächenstruktur erhalten werden [81].

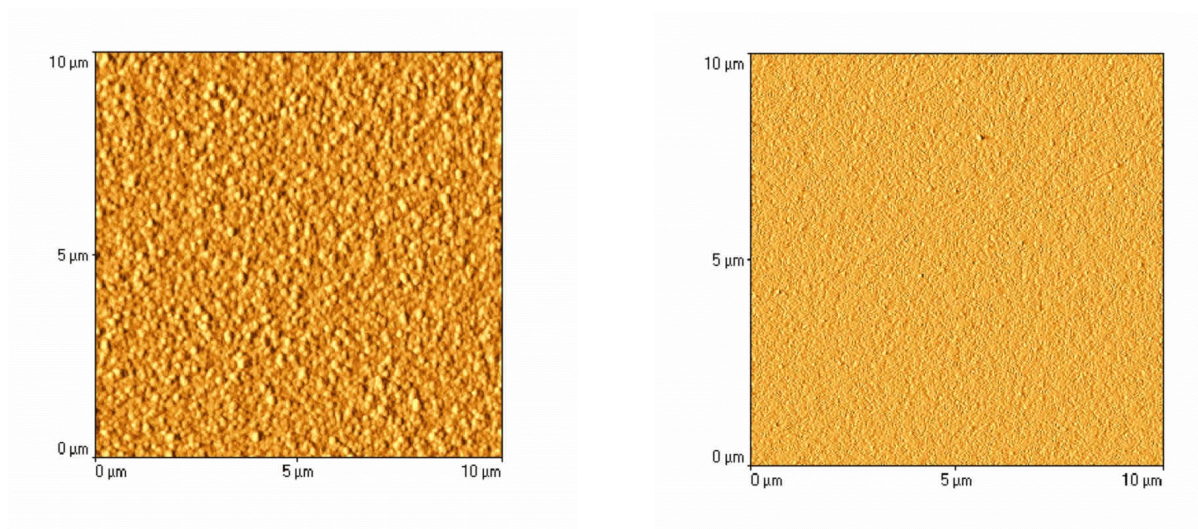


Abb. 3.1: AFM-Aufnahmen der Oberflächen einer unbeschichteten Dickschicht-Elektrode (links) und eines GOD-Sensors (rechts) [Aufnahmen von L. Weissner, Digital Instruments]

Die Oberfläche der unbeschichteten Elektrode erscheint als Ergebnis des Sinterns der Platinpaste im Hochtemperaturofen homogen, die Rauigkeit kann mit Werten zwischen 10 und 100 nm abgeschätzt werden. Dagegen erscheint die Oberfläche der Enzymmembran völlig glatt, da die GOD-Paste sich vor ihrer Fixierung aufgrund ihrer relativ niedrigen Viskosität gleichmäßig über die Elektrodenoberfläche verteilt hatte.

3.4.3 Präparation der Peroxidase-Sensoren

Native bzw. rekombinante Peroxidase wurde in verschiedenen Konzentrationen in deionisiertem Wasser gelöst, welches bei einigen Versuchen mit Additiven versetzt war. Je 4 μL dieser Lösungen wurden sorgfältig mit einer Pipette auf die Arbeitselektrodenfläche einer Dickschicht-Elektrode verteilt. Diese ruhte dabei absolut eben auf einem Dreibein (Wehrla), das mit einer Linse zur exakten Nivellierung versehen war. Anschließend wurden die Sensoren für eine Stunde dunkel abgedeckt. Nach dem Trocknungsvorgang hatte sich eine homogene Proteinschicht auf der Arbeitselektrode ausgebildet, die mit Hilfe eines Rakels glatt mit UV-polymerisierbarer Paste überzogen wurde. Im UV-Belichter wurde diese Schicht wie bei den GOD- und LOD-Pasten fixiert und die Sensoren in Puffer gestellt, da sich ansonsten die hier relativ dicke Pastenschicht nach dem Austrocknen ablösen konnte.

Eine weitere Variante war das Einmischen von gelöster HRP mit Additiven in die UV-Paste (20 μL Lösung in 35 mg UV-Paste), die dann direkt auf die Graphit-Elektroden gedruckt wurde. Prinzipiell konnte die UV-Paste auch durch Sonnenlicht polymerisiert werden, was in etwa 2

Stunden in Anspruch nahm (Resultate nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurden auch Graphit-Dickschicht-Elektroden vor dem Aufbringen des Enzyms maschinell poliert (Kleinbohrmaschine Sirius, Maxicraft, Polieraufsatz Geschoßspitzenform), wodurch die Oberfläche sehr glatt und glänzend wurde. Vor dem Beschichten erfolgte mit fusselfreiem Tuch (Kimwipes) nass die Endreinigung. Eine Behandlung im Ultraschallbad war nicht möglich, da die gebrannten Schichten durch die Vibrationen absplitterten.

3.4.4 Festkörperelektroden

Als Festkörperelektroden wurden stabförmige Glassy-Carbon-, Platin- und Goldelektroden eingesetzt, die zylindrisch mit Teflon ummantelt waren (Metrohm, Herisau, Schweiz). Als Arbeitselektrodenfläche diente die freiliegende Querschnittsfläche, die jeweils etwa 7,0 mm² betrug. Außerdem wurde mit in der GBF abgedrehten Stäben aus Reinstgraphit (Ek 50, Ringstorff-Werke, Bonn - Bad Godesberg) gearbeitet, welche seitlich mit Teflonband isoliert wurden. Bei diesen Elektroden ergaben sich geometrische Oberflächen von etwa 12,6 mm².

3.4.5 Referenzelektroden

Als Referenzelektroden dienten im Regelfall Ag/AgCl-Glaselektroden (Ingold, Steinbach), es konnten aber auch andere Elektroden wie Platin-Dickschichten als (Pseudo-)Referenzelektroden eingesetzt werden. In der Bioprozessanalytik wurden ausschließlich letztere verwandt.

3.5 Durchführung von Analysen und Charakterisierungen

3.5.1 Bestimmung der Proteinmassen durch Gelanalytik

Die Massenbestimmung der Proteine wurde mittels SDS-Gradientengelen (8-25 %) mit der Phast-Gel-Anlage von Pharmacia (Uppsala, Schweden) nach der vorgesehenen Anweisung durchgeführt. Verwendet wurde ein LMW(Low Molecular Weight)-Standard (14.400, 20.100, 30.000, 43.000, 67.000 und 94.000 D), der wie die Gele von Pharmacia bezogen wurde.

3.5.2 Ermittlung des Proteingehalts gelöster HRP

Der Proteingehalt der beiden Chargen rekombinanter HRP, die eingefroren in wäßriger Lösung erhalten worden waren, wurde optisch mit dem Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Als Standard für diesen quantitativen, photometrischen Test diente

eine BSA-Lösung, zur Kontrolle wurde auch eine Lösung nativer HRP (Biozyme, Gwent, Großbritannien) vermessen. Es ergab sich ein Proteingehalt von rund 10 µg/µL (Charge 1: 10,2 µg/µL; Charge 2: 10,7 µg/µL), was die vom Projektpartner erhaltenen Angaben bestätigte.

3.5.3 Bestimmung der Proteingröße durch Light-Scattering

Die Untersuchungen zur Ermittlung der Größe des Enzyms Horseradish Peroxidase in Lösung wurden mit dem Gerät DynaPro 801 (Protein Solutions, Charlottesville, USA) durchgeführt. Die Ansteuerung sowie die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Dynamics (Version 2.1, Protein Solutions, Charlottesville, USA) realisiert.

Vermessen wurde sowohl die native HRP von Biozyme als auch die der Firma Boehringer im Monomodal-Modus, ebenso beide Proteine nach Behandlung zur Deglykosilierung mit α -Mannosidase. Gelöst waren die Enzyme in 30 mM KPi pH 5,0, die Proteingehalte betrugen 2,0 mg/mL. Je 30 µL α -Mannosidase wurden zu 500 µL (Biozyme) bzw. 600 µL (Boehringer) Enzymlösung pipettiert, inkubiert wurde über 15 h bei 37°C.

3.5.4 Durchführung der Deglykosilierung

Die Pufferbedingungen im Deglykosilierungsansatz orientierten sich an für die GOD bereits vorliegende Erfahrungen [82]. Durchgeführt wurden sie in 30 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 für eine Dauer von 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C. Eingesetzt wurden in der Vorlage 100 ng HRP bzw. GOD in 100 µL KPi, dazu wurden dann in der Regel jeweils um die 10 µL der gelösten Deglykosilierungsenzyme α -Mannosidase (0,6 U) bzw. der Endoglykosidase H (10 mU) pipettiert. Da die verwendete Charge des letztgenannten Enzyms bereits deutlich das Haltbarkeitsdatum überschritten hatten, war die eingesetzte Menge zehnfach erhöht gegenüber der empfohlenen.

3.5.5 Aktivitätstest von gelöster HRP

Die spezifische katalytische Aktivität der rekombinanten und nativen Horseradish Peroxidase wurde mit der Tetramethylbenzidin(TMB)-Farbreaktion [83] auf Mikrotiterplatten aus Polystyrol (Maxi-Sorb, Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Dabei wurden 50 µL einer (verdünnten) Enzymlösung in Natrium-Acetat-Puffer (pH 5,5) in einer Kavität („well“) auf einer solchen Platte vorgelegt. Durch Zugabe von je 100 µL einer das Chromogen TMB sowie das Substrat H₂O₂ enthaltenden Lösung (siehe Abschnitt 3.3) wurde der Reaktionsassay komplettiert und gleichzeitig der enzymatische Umsatz des H₂O₂ gestartet. Bei der enzymatischen Reaktion

wird das Substrat Wasserstoffperoxid umgesetzt, das Enzym seinerseits wird dabei oxidiert. Durch die Reaktion mit dem TMB wird das Enzym wieder reduziert und steht erneut zum Wasserstoffperoxid-Umsatz (Reduktion) zur Verfügung. Dabei entsteht ein blaufärbtes Zwischenprodukt. Nach einer bestimmten Zeit (hier einheitlich 10 Minuten) wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μL 1,0 M Schwefelsäure abgestoppt, der blaue Farbstoff nahm unter den nun sauren Bedingungen eine gelbe Färbung an. Die optische Dichte wurde dann ausgelesen (450 nm vs. 650 nm; Reader von Molecular Devices, USA), der Grad der Gelbfärbung verhielt sich - bei den hier ausgewerteten optischen Dichten - proportional zur enzymatischen Aktivität. Der jeweils abgezogene Kontrollwert („Blindwert“) war stets sehr gering. Dieses Testformat, angelehnt an die ELISA-Technik, ermöglichte aufgrund der 96 Kavitäten pro Platte einen hohen Probendurchsatz. Stets wurde mit drei parallelen Ansätzen gearbeitet, der Mittelwert bildete den Meßwert.

3.5.6 Ermittlung der enzymatischen Aktivität immobilisierter HRP

Die mit nativer bzw. rekombinanter HRP beschichteten Dickschicht-Elektroden wurden in einem 20 mL Puffer fassenden Glasgefäß untersucht. Gemessen wurde stets mit einem Drei-Elektroden-Aufbau, in welchem die mit Enzym beschichtete Fläche die polarisierte Arbeitselektrode war. Als Referenzelektroden wurden wahlweise Ag/AgCl-Elektroden (Ingold, Steinbach) oder die aufgedruckten Pt-Dickschicht-Elektroden gewählt, die Hilfelektrode bestand aus Platindraht.

Zur Messung wurden die beschichteten Sensoren zunächst für fünf Minuten in den Meßpuffer gestellt, um eine Benetzung der Pasten- und Proteinschicht durch die Flüssigkeit zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Polarisierung der Arbeitselektrode mit dem gewünschten Potential bezogen auf die verwendete Referenzelektrode. Nach der Einstellung des konstanten Grundstroms konnte mit der sukzessiven Zugabe des Enzymsubstrats H_2O_2 begonnen werden, wobei nach jeder Zugabe abgewartet wurde, bis die sich neu einstellende Stromstärke konstant blieb (Abb. 3.2). Auf diese Weise wurden die sich einstellenden Stromstärken zur jeweiligen Substratkonzentration erhalten, durch den Schreibervorschub war auch die Ansprechzeit bis zur Signalkonstanz der Sensoren zu ermitteln.

Im Sinne einer effektiven Durchmischung kam ein Propellerrührer zum Einsatz, der stets mit konstanter Drehzahl betrieben wurde, um gleichbleibende Konvektions- und Diffusionsverhältnisse zu gewährleisten. Die Anordnung aller Komponenten, insbesondere die Ausrichtung der Dickschicht-Elektrode, war bei diesen Experimenten immer gleich. Die Volumenzunahmen durch die zugegebenen Lösungen waren vernachlässigbar, da zu dem vorgelegten Puffer (20 mL) je 20 μL der Wasserstoffperoxid-Lösung (10 mM) dosiert wurden,

bis die Substratsättigung erreicht war. Insgesamt waren dazu meist 400 µL erforderlich. Für Messungen mit dem Mediator wurde frisch angesetzte Hydrochinon-Lösung zugegeben, das Volumen betrug hier in der Regel 200-400 µL. Die weitere Zugabe des Substrates Wasserstoffperoxid, die erforderlich war, um die Substratsättigung auch für Mediatormessungen zu erreichen, geschah mit einer höher konzentrierten H₂O₂-Lösung, um das Zugabevolumen gering zu halten.

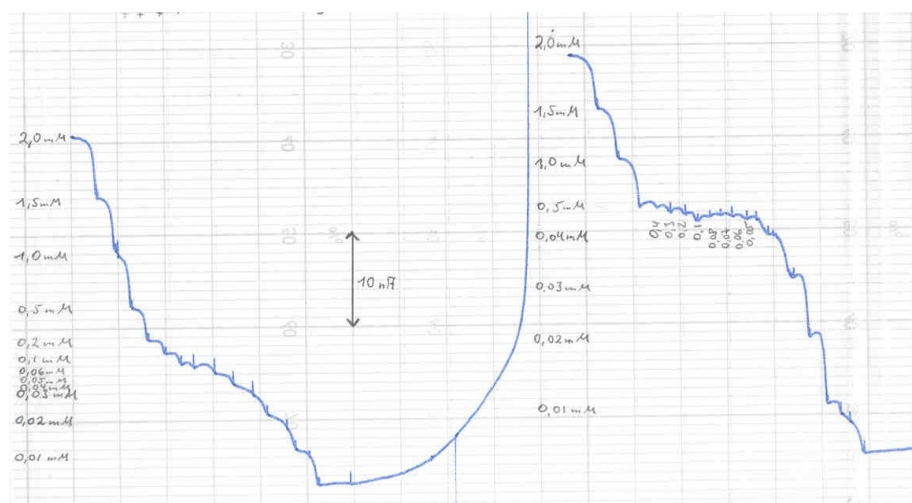


Abb. 3.2: Schreiberprotokoll der Aufnahme von direktem Elektronentransfer (Stromstärken bei sukzessiver Zugabe von H_2O_2 zu einer HRP-beschichteten Elektrode, Zeitachse von rechts nach links)

Bei zykelvoltametrischen Untersuchungen kam der Potentiostat 263A der Firma Eg&G Instruments (Princeton, New Jersey, USA) mit Meßwerterfassung durch den angeschlossenen Computer zum Einsatz. Amperometrische Messungen wurden mit dem Modell 641 von Metrohm (Herisau, Schweiz) durchgeführt, die Daten wurden mit einem Flachbettschreiber (BD 112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) aufgenommen.

3.5.7 Ermittlung der Dispersionskoeffizienten in den verwendeten FIA-Systemen

Der jeweilige Dispersionskoeffizient D des betreffenden FIA-Aufbaus wurde mit Hilfe einer polarisierten Platin-Dickschicht-Elektrode (+600 mV vs. Pt-Dickschicht) in der Detektorzelle ermittelt. Dazu wurde das resultierende Signal bei Verwendung einer Wasserstoffperoxid-Lösung (0,1 mM H_2O_2 in 0,1 M Clark & Lubs - Puffer, pH 8,0) als Carrier ins Verhältnis gesetzt

wurde zu demjenigen, welches bei Injektion dieser Lösung in das FIA-System erhalten wurde. Diese beiden Signale waren proportional zur jeweiligen H_2O_2 -Konzentration, das Verhältnis beider Signalhöhen entsprach daher der Verdünnung der injizierten Lösung im Fließweg zur Detektorzelle.

3.6 Modellierung der Wechselwirkungen von HRP mit Oberflächen und Additiven

3.6.1 Berechnung der Elektronentransferraten in nativer und rekombinanter HRP

Die Elektronentransferraten innerhalb der Proteine wurden mit dem Programm etunnel [84] in der Abteilung Strukturforschung von Dr. H.J. Hecht und Dr. J. Reichelt berechnet, die graphische Darstellung erfolgte ebendort mit Hilfe des GRASP-Programmes [85].

3.6.2 Dockingberechnungen von nativer und rekombinanter HRP an einer Graphitoberfläche

Die Dockingberechnungen der drei Proteinvarianten wurden mit dem Programm Autodock ausgeführt (Version 2.4 [86]), wobei das Protein als beweglicher „Ligand“, die Graphitoberfläche gitterähnlich als planarer „Rezeptor“ behandelt wurde. Ausgeführt wurden je 100 Dockingberechnungen mit jeweils zufälligen Orientierungen der Proteine zu Beginn. Das Volumenelement, in dem die Berechnungen ausgeführt wurden, entsprach einem Kubus mit einer Kantenlänge von 100 Å und einem definierten internen Berechnungsgitter mit einer Schrittweite von 1,25 Å. Aufgrund von Rechnerkapazität und programminhärenten Limitierungen konnten die Flexibilität von Seitenketten des Proteins sowie funktionelle Gruppen auf der Graphitoberfläche nicht in die Berechnungen einbezogen werden. Die Graphitoberfläche wurde lediglich als hydrophobe Ebene angesehen. Die Grundlage der HRP-Daten bildeten die Koordinaten aus einer Proteindatenbank (pdb-id 2atj [87]), die Glykosilierungen wurden mit dem Glyco-Webserver SWEET [88] basierend auf den Referenzen von Gajhede [87] an den acht Asparaginsäureresten [89] generiert. Deren Faltung am Protein sowohl in wässriger Lösung wie auch im Vakuum als trockener Zustand wurden mit dem Programm Amber 5.0 [90] berücksichtigt. Als Achsen zur Festlegung der Ausrichtung dienten im ellipsoiden Protein eine lange (C_α Arg94 zu C_α Thr200) sowie eine kurze (C_α Asp67 zu C_α Ser117) Verbindungslinie der entsprechend bezeichneten Aminosäuren. Die Berechnungen wurden innerhalb der Abteilung Strukturforschung von Dr. U. Dengler, Dr. H.J. Hecht und Dr. J. Reichelt durchgeführt.

3.6.3 Dockingberechnungen von Additiven mit nativer HRP

Mit dem Programm Autodock 3.0 [86] konnte rechnerisch die Anlagerung (Docking) von Molekülen an das native Protein in Lösung simuliert werden. Berücksichtigt wurden dabei elektrostatische, hydrophobe, hydrophile und van-der-Waalsche Wechselwirkungen. Polymere wurden als kurze Untereinheiten mit funktionellen Gruppen definiert, da hiermit zum einen die Kapazitäten der Rechner nicht überschritten wurden, und zum anderen diese Molekülfragmente ausreichen sollten, um Aussagen über die Wechselwirkungen mit dem Protein in Lösung zu erhalten. Die freie Drehbarkeit der Atome bzw. funktioneller Gruppen in diesen Molekülen um die innermolekularen Bindungen wurde in den Simulationen berücksichtigt, was den hohen Rechenaufwand bedingte. Die Proteine und Kohlenhydratreste waren hingegen unbeweglich. Es wurden die Anlagerungen von Gafquat 755 N, Polylysin, Polyethylenimin und DEAE-Dextran an die native HRP in Lösung berechnet. Ausgehend vom nativen Enzym wurde die Anlagerung von jeweils 100 Polymeruntereinheiten an das Protein simuliert. Diese Einheiten wurden rechnerisch aus zufälligen Richtungen kommend in ein das Protein enthaltendes Volumenelement eingebracht, die statistische Auswertung der sich jeweils ergebenden Docking-Zustände an das Protein bzw. seine Kohlenhydratreste entsprach dem letztlich wahrscheinlichsten, d.h. energieärmsten eines jeden Moleküls.

Die Anlagerung von Gafquat 755N an die HRP wurden mit nativer HRP als „Rezeptor“ und Gafquat-Untereinheiten als „Ligand“ simuliert. Die Gafquat-Untereinheit, definiert als kurzes Polymer mit zwei unterschiedlichen Seitenketten, wurde unter Verwendung des Programms Cerius²3.0 (Molecular Simulations Inc., USA) erstellt. Zur Strukturoptimierung und Einführung von Partialladungen diente das Programm HyperChemTM 4.5 (HyperCube Inc., USA). Die graphischen Darstellungen der Anlagerungen wurden erstellt mit Molscrip [91], Grasp [85] sowie Bragi [92] und mit gl_render (L. Esser, unveröffentlicht) und PovRayTM wiedergegeben. Die Berechnungen wurden innerhalb der Abteilung Strukturforschung von Dr. U. Dengler, Dr. H.J. Hecht und Dr. J. Reichelt durchgeführt, ebenso die graphischen Darstellungen angefertigt.

3.7 On-line Bioprozessanalytik

On-line Bioprozessanalytik wurde bei verschiedenen Kultivierungen von tierischen Zellen hinsichtlich Glukose und Laktat betrieben. So wurden Daten zur on-line Analytik von Laktat bei einer in der Arbeitsgruppe Zellkultur durchgeführten Kultivierung der Hybridomzelllinie K4E7 erhalten. Die PI-Regelung der Perfusionsrate basierend auf on-line Glukoseanalytik wurde bei einer von G.W. Piehl in der Arbeitsgruppe Zellkultur im Bereich Bioverfahrenstechnik der GBF durchgeführten Fermentation von HeLa-Zellen im 100-Liter Fermenter entwickelt und

angewandt, ebenso bei einer Kultivierung von CHO-Zellen (Hamster-Zelllinie CHO-3D6) durch Dr. L.R. Castillo im Bereich Bioverfahrenstechnik der GBF. Die Programmierung des UBICON-Systems erfolgte durch J. Nothnagel. Weiterhin wurde on-line Glukoseanalytik bei Kultivierungen von *Aspergillus niger* durchgeführt, fermentiert hatte diese Zellen Dr. M. Ganzlin aus der Arbeitsgruppe Mikrobielle Systeme im Bereich Bioverfahrenstechnik.

3.7.1 FIA zur Bioprozessanalytik bei Kultivierungen tierischer Zellen

Zur Bioprozessanalytik tierischer Zellkulturen wurde eine Fließinjektions-Analyse-Apparatur (FIA) eingesetzt, die in einer früheren Arbeit entwickelt worden war [65]. Der Aufbau entsprach dem Schema in Abbildung 3.3.

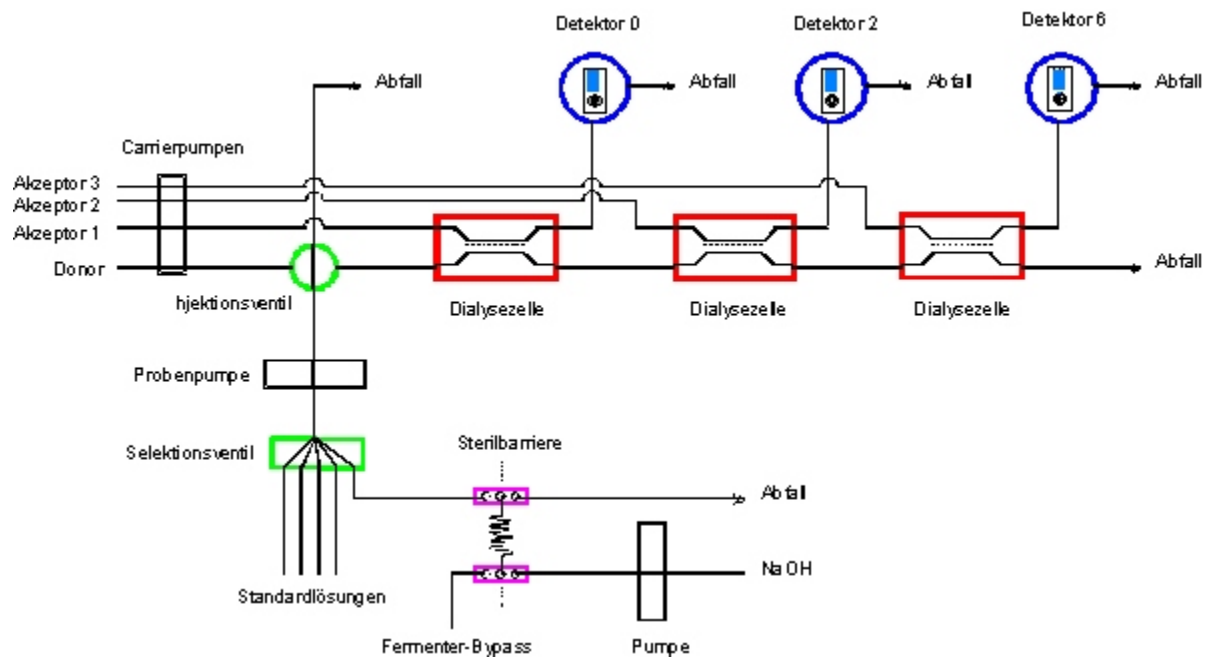


Abb. 3.3: Schema der FIA-Apparatur zur Bioprozesskontrolle bzw. -regelung

Sämtliche Komponenten des Systems befanden sich in einem Industrienormgehäuse (Bopla, Bünde) und konnten mit einem angeschlossenen PC (Pentium-Prozessor) angesteuert werden. Verwendet wurde dazu die in der GBF entwickelte Software FiaFox (Version 2.11) [70], die eine variable Erstellung von Programmabläufen in drei Hierarchieebenen gestattet. Integriert ist eine automatische Meßwerterfassung, mit der die Signale der angeschlossenen Potentiostaten simultan aufgenommen sowie im Analysenserien-Modus prozessiert werden können. Sämtliche relevanten Parameter werden in entsprechenden Dateien dokumentiert, die Übertragung

(ausgewählter) berechneter Werte ist während des Betriebes über einen com-Port des Computers an das externe Prozessleitsystem UBICON [76] möglich.

Im automatischen Betrieb wurden in regelmäßigen Abständen reproduzierbar ein bestimmtes Volumen an Kalibrierlösung bzw. Probe aus dem Fermenterbypass in den Donorstrom injiziert. Das injizierte Flüssigkeitssegment wurde im Donorstrom mitgeführt und durch das parabolische Geschwindigkeitsprofil über den Schlauchquerschnitt axial durch Dispersion verdünnt [69]. Nach einigen Sekunden wurde der Donorstrom für die Dauer von zwei Minuten gestoppt, das verteilte Flüssigkeitssegment befand sich nun in den Dialysezellen und die Diffusion der niedermolekularen Analyten in die ebenfalls gestoppten Akzeptorströme wurde ermöglicht. Nach einer festgelegten stop-flow Zeit wurden sowohl der Donor- als auch die Akzeptorströme durch Pumpenstart weiterbewegt. Die Akzeptorströme mit den eingetretenen Analyten wurden durch die Detektorzellen mit den eingesetzten Enzymsensoren geführt. In den flüssigkeitsdurchlässigen Membranen der Dickschicht-Sensoren fanden dann enzymkatalysiert die spezifischen Umsetzungsreaktionen durch die jeweiligen Oxidasen statt. Das Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid verursachte an den positiv polarisierten Elektrodenoberflächen durch seine Oxidation einen Stromfluß, der im linearen Bereich proportional zur Konzentration des jeweiligen Analyten war. Die resultierende Stromstärke auf der enzymfreien Elektrode wurde als Blindwert von der jeweiligen Stromstärke der enzymbeschichteten Elektrode abgezogen. Ein Meßzyklus bestand aus der Vermessung der Kalibrierlösungen und anschließend der Probe aus dem Fermenter. Den Abschluß einer solchen Serie bildete die Kalibration und, basierend darauf, die Berechnung des Gehaltes an Glukose (bzw. Laktat) in der Probenflüssigkeit. Nach jedem Zyklus wurde die Sterilbrücke, bestehend aus einer 1 m langen Schlauchwendel, für 5 min mit 1,0 M Natronlauge durchspült und dadurch desinfiziert, um eine Kontamination des Bioreaktors zu vermeiden. Für die Dauer der Vermessung der Kalibrierlösungen blieb dann die Sterilbrücke mit Natronlauge gefüllt.

Die verwendeten Peristaltikpumpen konstanter Drehzahl konnten mit farbcodierten Pumpschläuchen unterschiedlicher Innendurchmesser betrieben werden, wodurch die Fließraten festgelegt wurden. Zum Einsatz kamen solche mit 0,7 mL/min (orange/orange) sowie 1,0 mL/min (grau/grau). Mit dem Selektionsventil wurde der entsprechende Kanal zur Auswahl der zu vermessenden Lösung freigegeben, bei Ansaugen der Fermenterprobe wurden die 2/3-Wege-Ventile an der Sterilbrücke entsprechend geschaltet. Nachdem die Injektionsschleife ($V = 40$ oder $100 \mu\text{L}$) mit Kalibrierlösung bzw. Probe gefüllt war, wurde sie durch Drehen des Ventilkopfes reproduzierbar in den Fließweg des Donorstroms eingebracht.

Die in Serie geschalteten Dialysemodule, die den Übertritt niedermolekularer Stoffe vom Donorstrom in die einzelnen Akzeptorströme ermöglichten, sind wie die wall-jet-Detektorzellen in der GBF gefertigt worden und bestanden aus Plexiglas. In diesem Aufbau wurden wall-jet-

Detektorzellen ohne Konus eingesetzt, die ansonsten baugleich waren mit der in [93]. Der Einlaß des Akzeptorstroms wurde senkrecht zur Sensoroberfläche gewählt. Als Dialysemembranen wurden diejenigen der Firma Spectra/Por (Spectrum Laboratories, USA/Kanada) mit einer Ausschlußgrenze („Cut-Off“) von 12.000-14.000 D eingesetzt. Die Potentiostaten polarisierten die jeweiligen Arbeits- und Blindwertelektroden stets mit einer konstanten Spannung von +600 mV, bezogen auf die Platin-Dickschicht-Referenzelektrode. Die jeweilige Hilfselektrode bildeten nichtrostende HPLC-Edelstahlrohre mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm, welche im Einlaßkanal der wall-jet-Zellen in die Fittings (Verbinder) eingeschraubt waren. Die Akzeptorströme einer jeden Dialysezelle konnten ohne Aufwand beliebig mit jeder Detektorzelle verbunden werden, da die entsprechenden Teflonschlauchenden mit kurzen Überschläuchen versehen wurden und so einfach auf die Edelstahlrohre im Eingangskanal der Detektorzellen geschoben werden konnten. Es resultierten niedrigere Stromstärken als bei den bisher verwendeten Injektionsnadeln, die bis unmittelbar vor die Dickschicht-Elektrode reichen und den Flüssigkeitsstrom fokussiert auf die Elektrodenflächen leiten. Die erhaltenen Stromstärken waren für die analytische Zielsetzung dennoch ausreichend hoch. Der Vorteil der schnellen Wechsellmöglichkeit überwog daher, zumal durch Erhöhung des Injektionsvolumens leicht eine Veränderung der Konzentrationsprofile in den Detektorzellen herbeigeführt werden konnte, die den Verdünnungseffekt in der Zelle im Vergleich zur Verwendung einer Injektionsnadel kompensierte. Clark & Lubs - Puffer (pH 8,0) war in der Regel sowohl Donor- als auch Akzeptorpuffer, die Kalibrierlösungen enthielten 0,05 % w/v Natriumazid zur Verhinderung mikrobiellen Bewuchses. Es wurden im Dauerbetrieb drei Kalibrierlösungen mit unterschiedlichen Gehalten an Glukose und Laktat verwendet (0,5 g/L Glukose, 1 g/L Laktat; 1,0 g/L G., 2,0 g/L L.; 2,0 g/L G., 4,0 g/L L.).

Der Programmablauf war im Regelfall derart, daß in regelmäßigen Abständen drei Glukosestandardlösungen (0,5, 1,0 sowie 2,0 g/L) zur Kalibration sowie eine Probe aus dem Fermenter je einmal vermessen wurden. Im Analysenserienmodus der FiaFox-Software wurde aus den gemessenen Stromstärken der Enzymsensoren mittels linearer Regression dann eine Kalibration der enzyspezifischen Signale erstellt. Der Glukosegehalt der Fermenterprobe wurde augenblicklich errechnet und über die com-Schnittstelle des PCs an den Rechner des übergeordneten Prozessleitsystems UBICON transferiert. Hier wurden alle relevanten Daten der Kultivierung wie Sauerstoffpartialdruck, Zusammensetzung der Begasung, pH-Wert der Kulturbrühe, Drehzahlen der Peristaltikpumpen der Fermenterperipherie, das Gewicht der Ernteflasche sowie der Glukosewert der FIA-Apparatur dokumentiert. Durch die Ansteuerung der Pumpe, mit der das Frischmedium aus dem Vorratsgefäß dem Fermenter zugeführt wurde, wurde der Glukosegehalt - und indirekt auch der Gehalt an allen anderen Nährstoffen - im

Fermenter reguliert. Im UBICON-Prozessleitsystem wurde im Verlauf der Kultivierung von HeLa-Zellen (im 100 Liter Fermenter) eine PI-Regelung generiert, bei der ein bestimmter Glukosegehalt als Sollwert vorgegeben wurde. Der von der FIA-Apparatur zeitdiskret ermittelte Glukosegehalt fungierte dabei als Istwert, Stellgröße war die Drehzahl der Frischmediumpumpe. Die jeweils gültigen Zahlenwerte des Proportionalbeiwerts sowie der Integrationskonstante in der Regelungsgleichung wurden im Falle der Kultivierung von CHO-Zellen im 2-Liter-Maßstab mit fortschreitender Kultivierungsdauer und damit einhergehender Biomassezunahme adaptiert, um dem damit verbundenen erhöhten Nährstoffbedarf gerecht zu werden.

3.7.2 Verwendetes Anschlußmodul von Fermenter zur FIA bei Kultivierungen tierischer Zellen

Die Probenahme durch die FIA-Apparatur geschah durch einen Anschluß an den Perfusionsschlauch. Diese Verbindung mußte unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden, um eine Kontamination der Kultur zu vermeiden. Realisiert wurde dies durch eine Verschraubung verschiedener Bauteile mittels O-Ringen (Omnifit, Cambridge, Großbritannien) aus Silikon, wodurch der innere Fließweg gegenüber der Umwelt abgedichtet wurde (Abb. 3.4). Außerdem mußte die Verbindungseinheit als Adapter fungieren, da an der Perfusionsleitung ein Silikonschlauch angesetzt war, die Verbindung zur FIA-Apparatur jedoch durch einen Teflonschlauch gebildet werden mußte.

In eine Edelstahl-Kupplung, die aus einer HPLC-Injektionsnadel hergestellt worden war, wurde ein Edelstahl-Fitting (mit Rohraufsatz, Fremdherstellung) eingeschraubt und ein O-Ring eingelegt. Über den Rohraufsatz wurde der Silikonschlauch zur Perfusionsleitung geschoben und mit Kabelbindern fixiert. Der Teflonschlauch zur FIA-Apparatur war beidseitig gebördelt, ein sogenanntes Greifer-Fitting (edelstahlummantelte Teflonhülse, Omnifit, Cambridge, Großbritannien) zwischen Polypropylen-Fitting (Omnifit, Cambridge, Großbritannien) und Bördelung gewährte dem Schlauch sowohl festen Halt als auch ein schonendes Anpressen desselben ohne Unebenheiten beim Einschrauben. Ein Schlauchende wurde, nach Desinfektion des Innengewindes, mit einem O-Ring in das Selektionsventil der FIA-Apparatur eingeschraubt, das andere in 2 M Natronlauge getaucht. Durch mehrstündiges Spülen wurde dann dieses Schlauchstück einschließlich der Sterilbrücke desinfiziert. Die Kupplung wurde nach dem Anschluß an den Fermenter und Umhüllung mit Aluminiumfolie mit diesem sterilisiert, danach das Fitting der Schlauchverbindung zur FIA-Apparatur unter den sterilen Bedingungen der Clean-Bench eingeschraubt. Verschlußmuttern aus Polypropylen (Omnifit, Cambridge, Großbritannien) stellten den festen Sitz der Fittings sicher.

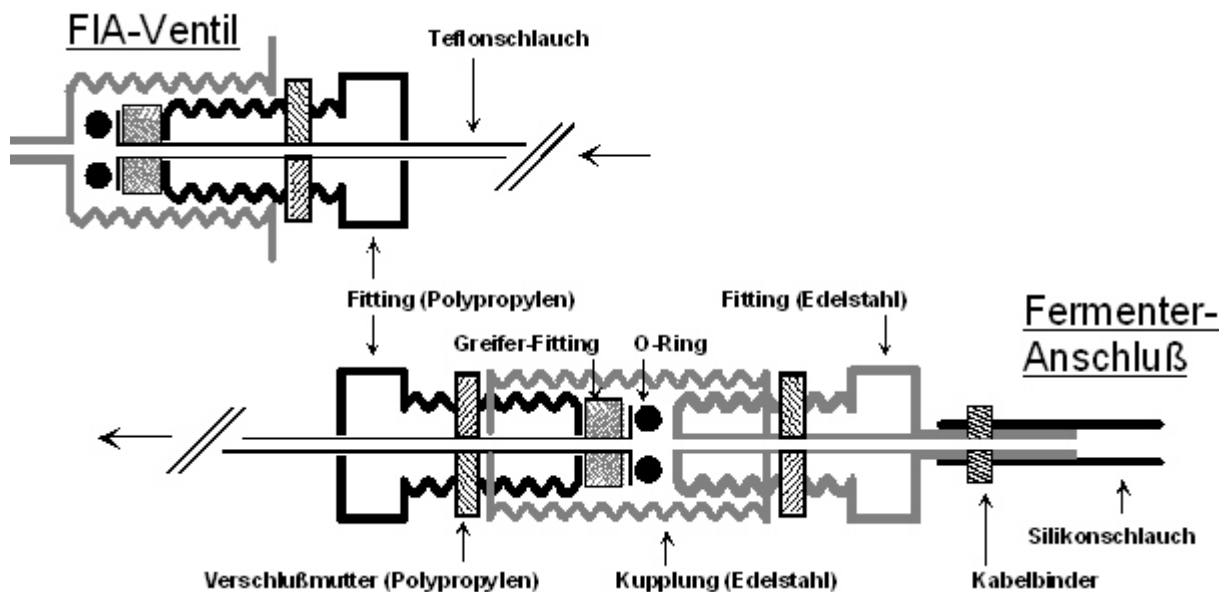


Abb. 3.4: Aufbau des Verbindungsmoduls vom Fermenter zur FIA-Apparatur

Bei der Kultivierung der Maus-Hybridom-Zellen (Klon K4E7, ZKT1-Medium basierend auf [94] mit 5% FCS, Resultate hinsichtlich der on-line Laktat-Analytik) war der Anschluß der FIA-Apparatur noch durch das Einkleben des Teflonschlauches in den Silikonschlauch, der zum 2-Liter-Fermenter führte, unter den sterilen Bedingungen der Clean-Bench realisiert worden. Das oben beschriebene Modul stand noch nicht zur Verfügung.

3.7.3 Komplett Aufbau des Fermenters mit FIA-Apparatur

Der schematische Aufbau der wichtigsten Elemente der Fermenterperipherie ist in Abbildung 3.5 für die Kultivierung im 100-Liter Fermenter dargestellt. Das Prozessleitsystem UBICON archivierte die Daten der angeschlossenen Geräte wie aller Pumpen und Meßsysteme (pH-Sonde, Gasanalysatoren, Thermometer). Umgekehrt wurde auf der Basis dieser Daten der Sauerstoff- bzw. Stickstoffanteil der blasenfreien Begasung durch Acurell-Membranschläuche (0,2 - 0,3 μm Porengröße) geregelt, ebenso der pH-Wert in der Kulturbrühe sowie die Förderraten aller Pumpen. Über einen Bypass wurde ständig Fermentermedium durch eine Querstromfiltrationseinheit (PROSTAK, 0,2 μm , Millipore, Eschborn; eingesetzt wurden 3 mal 10 STAK-Module) gepumpt (Pumprate 400 L/h). Basierend auf den ermittelten Glukose-Werten der FIA-Apparatur wurde durch das UBICON-System die Drehzahl der Perfundatpumpe - und somit die Abfuhr zellfreien (verbrauchten) Mediums - derart geregelt, daß der Gehalt an Glukose im Fermenter dem eingestellten Sollwert möglichst angeglichen wurde.

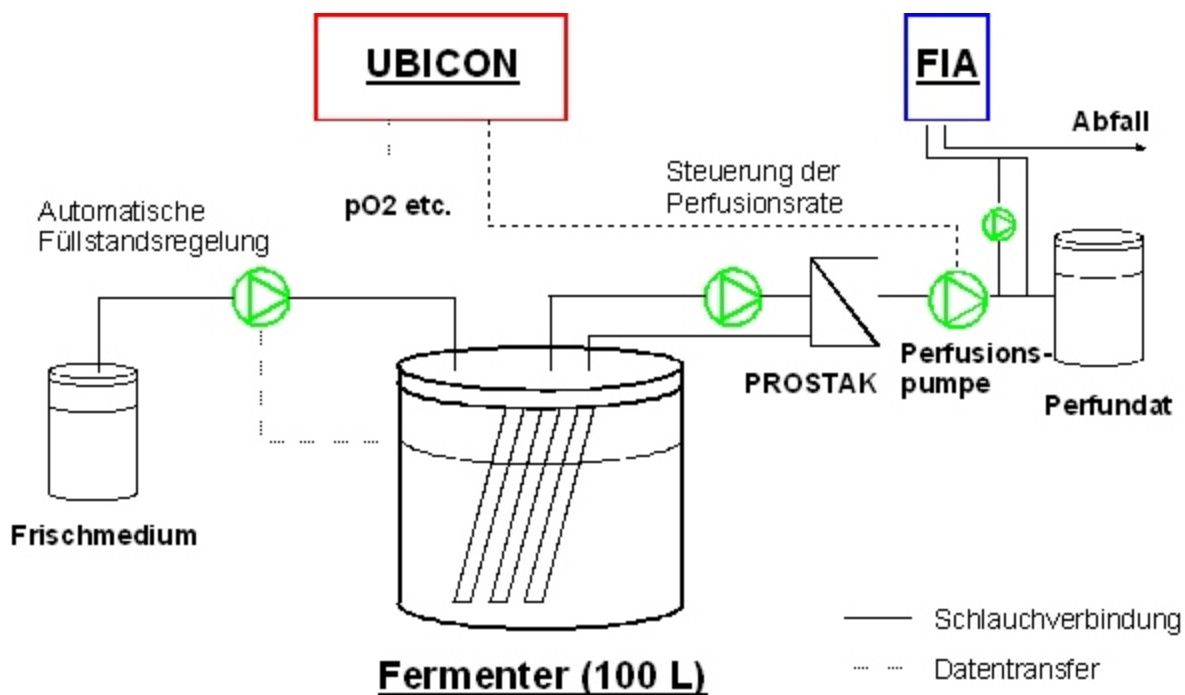


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Fermenterperipherie mit Verschlauchungen und Datentransferwegen

Die Förderrate der Perfundatpumpe konnte als konstant angesehen werden, sie änderte sich bei den unterschiedlichen Druckverhältnissen im System während der Zellkultivierung nur minimal. Eine mit der Frischmediumpumpe verbundene Füllstandssonde im Fermenter sorgte für ein stets gleichbleibendes Flüssigkeitsniveau, indem bei Mediumentnahme unverbrauchtes Medium zugeführt wurde. Die Bemessung der weiteren Mediumkomponenten wie Nährstoffe und Vitamine stellte immer eine ausreichende Versorgung der Zellen sicher, Glukose als wichtigste Energie- und Kohlenstoffquelle war limitierend.

3.7.4 FIA zur Untersuchung von Elektroden und zum Einsatz bei Kultivierungen von *Aspergillus niger*

Bei Untersuchungen von Dickschicht-Elektroden sowie zum on-line-Monitoring von *Aspergillus niger* - Kultivierungen wurde das Fließinjektions-Analyse-System TAS 2000 (Trace, Braunschweig) eingesetzt, bei dem die zu injizierende Flüssigkeit direkt in den die Detektorzelle durchströmenden Trägerstrom eingebracht wurde (Abb. 3.6).

Der modulare Aufbau gestattete die Insertion mehrerer Einbauten (Kartuschen, Schlauchwendel) zwischen Injektionsventil und Detektionsmodul zur kontrollierten Beeinflussung der Dispersion.

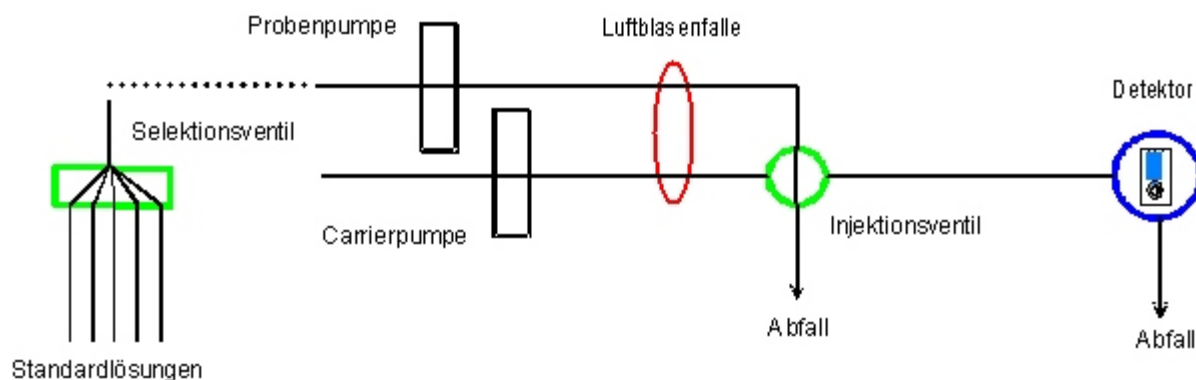


Abb. 3.6: Schema der TAS 2000 - FIA zur Untersuchung von Elektroden sowie zum Monitoring von *Aspergillus*-Fermentationen

Als Detektionsmodul für die unterschiedlichen Elektroden diente wahlweise die wall-jet Detektorzelle der Firma Trace oder diejenige der GBF mit Konus [93], bei der ein Platinrohr (Innendurchmesser 0,8 mm) zugleich als Einlaß und Hilfselektrode eingesetzt wurde. Beide Detektorzellen waren hinsichtlich der Geometrie der Fließwege prinzipiell baugleich und unterschieden sich nur geringfügig in ihren Abmessungen. Die verwendeten Flüssigkeiten wurden vor Eintritt in das Injektionsventil durch die Luftblasenfalle Trace-trap (Trace, Braunschweig) geführt, wodurch sie effektiv entgast wurden. Die peristaltischen Pumpen konnten mit verschiedenen Drehzahlen betrieben werden, was die Variation der jeweiligen Fließrate ohne Tausch der Peristaltikpumpschläuche ermöglichte. Das Injektionsvolumen wurde durch Wahl von Injektionsschleifen unterschiedlicher Länge bzw. unterschiedlichen Innendurchmessers bestimmt, das Rotor-Stator-Prinzip des Injektionsventils stellte eine pulsationsfreie Schaltung sicher. Die einzelnen Komponenten der TAS-FIA wurden mit Schläuchen aus Teflon (Innendurchmesser 0,8 mm; Omnifit, Cambridge, Großbritannien) und Fittings (Polypropylen) verbunden. Die Steuerung des TAS 2000 Systems wurde durch einen Rechner mit der mitgelieferten Software (TAS 2000, Version 2.002) realisiert, die eine schnelle und bequeme Programmierung gewünschter Abläufe gestattete. Allerdings war der Auswertemodus für Detektorsignale unbrauchbar, da die entsprechende Routine trotz ausgiebiger Variation der einzusetzenden Parameter nicht alle Meßsignale als solche erkannte. Deshalb wurden sämtliche Signale mit einem externen Zweikanalschreiber (BD 112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) aufgenommen, der direkt am Potentiostaten angeschlossen war.

3.7.5 Prozessmonitoring bei Kultivierungen von *Aspergillus niger*

Mit der TAS-FIA (Abb. 3.6) wurde bei zwei Kultivierungen von *Aspergillus niger*

Glukoseanalytik on-line durchgeführt [95]. Eingesetzt wurde dabei jeweils ein Dickschicht-Sensor der GBF im Doppellayout, auf dessen einer Arbeitselektrode das Enzym Glukoseoxidase immobilisiert war. Injiziert wurden in Serie Glukose-Standardlösungen (2,5, 5, 10, 15 und 20 g/L; 0,05 % w/v Natriumazid) und Probenflüssigkeit aus dem Fermenter. Die Glukose-Standardlösungen wurden, um Matrixeffekte zu minimieren, in Vogel-Medium [95] angesetzt, welches zur Kultivierung eingesetzt wurde. Als Carrierpuffer wurde Clark & Lubs - Puffer (pH 8,0) verwendet. Die Dispersion wurde mit Hilfe von Einbauten derart eingestellt, dass die injizierten Lösungen (Injektionsvolumen 6,6 µL) eine hohe Verdünnung erfuhren ($D = 52$). Ein kompletter Meßzyklus benötigte genau eine Stunde, die Aufnahme eines einzelnen Meßwertes aufgrund der notwendigen Verdünnung im Fließsystem sieben Minuten. Der etwa zwei Meter lange Schlauchweg vom Fermenter zur FIA-Apparatur sowie das Totvolumen der Sonde im Fermenter erforderte eine entsprechend lange Pumpzeit, weshalb über 15 Minuten Fermentermedium angesogen werden musste, um eine zum jeweiligen Zeitpunkt repräsentative Probe injizieren zu können. Die Fließrate des Carrierstroms (Peristaltikpumpschlauch Tygon, Kennung blau-blau) betrug 2,0 mL/min, die des Probenstroms (Peristaltikpumpschlauch Tygon, Kennung grau-grau) 0,5 mL/min bei Standardlösungen sowie bis zu 2,0 mL/min im Falle der Fermenterprobe.

Die *Aspergillus niger* - Kultivierungen wurden von Dr. M. Ganzlin in 12-Liter-Fermentern im Technikum der GBF durchgeführt. In eines der genormten Anschlußgewinde des Fermenters wurde eine Filtersonde (ESIP-Lab 5442, Eppendorf, Hamburg) eingeschraubt, durch die (filtriertes) Medium entnommen werden kann. An den Stutzen dieser Sonde wurde mit Kabelbindern ein wenige Zentimeter langes Silikonschlauchstück angebracht, an dessen anderem Ende sich ein Adapter aus Peek (Upchurch, USA) mit Oliven-Anschluß befand. Die zweite Seite des Adapters barg ein Innengewinde für die in der Fließinjektions-Analyse benutzten Fittings (UNF 1/4 "28Gg.), wodurch die Verbindung vom Adapter zum Selektionsventil der FIA-Apparatur mit Teflonschlauch (ID = 0,8 mm) ermöglicht wurde. Vor Beginn der Fermentation wurde diese Verbindung - eingewickelt in Aluminiumfolie und bereits vorautoklaviert - angeschlossen an den Fermenter zusammen mit diesem sterilisiert, wobei eine Schraubklemme den Silikonschlauch abdichtete. Der Anschluss an das Selektionsventil wurde vorgenommen, nachdem dieses mehrere Stunden mit 1,0 M Natronlauge durchspült und dadurch desinfiziert worden war. Beim Einschrauben der Schlauchverbindung wurde das Fitting mit Natronlauge benetzt, so daß eine Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Der Programmablauf war derart, daß zunächst in Serie je einmal die Kalibrierlösungen vermessen wurden und anschließend die Fermenterprobe. Die Zuverlässigkeit der Enzymelektrode sowie der Schaltvorgänge war sehr hoch und ließ eine Auswertung bei einmaligem Vermessen jeden Standards zu. Unterschiede in den erhaltenen Stromstärken

resultierten praktisch ausschließlich durch Temperaturschwankungen im 24-stündigen Turnus. Ein kompletter Zyklus erforderte eine Stunde.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Darstellung von direktem Elektronentransfer mit nativer und rekombinanter Peroxidase aus Meerrettich (HRP)

Zunächst wurden die native und rekombinante HRP durch Auftrennung im Gel in ihrer Proteinmasse sowie Reinheit der Chargen charakterisiert. Die native HRP wurde anschließend auf ihre Lagerstabilität in Lösung untersucht, wobei mit ausgewählten Additiven bei unterschiedlichen Temperaturen gearbeitet wurde. Als Additive kamen langkettige, geladene Polymere zum Einsatz, die aufgrund ihrer Größe in Biosensormembranen Verwendung finden können, da die Gefahr der Auswaschung nicht bzw. kaum gegeben ist. Diese Additive sind wasserlöslich und hatten sich in der Vergangenheit zum Teil als Enzymstabilisatoren bzw. den direkten Elektronentransfer begünstigend gezeigt.

Zur Realisierung direkten Elektronentransfers wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Untersucht wurde die Einmischung des Enzyms mit Additiven in die durch UV-Belichtung fixierbare Paste sowie die Adsorption auf Graphitpartikeln mit anschließendem Einmischen in die Paste und jeweiligem Siebdrucken auf die Graphit-Dickschicht-Elektroden. Außerdem wurde als aussichtsreichste Möglichkeit die Adsorption der Enzyme in Lösung sowie durch Adsorption nach Trocknung auf Dickschicht-Elektroden mit anschließendem Fixieren durch Überdrucken mit UV-Paste und anschließendem Belichten getestet. Detektiert wurde mit zyklischer Voltametrie sowie Amperometrie, gearbeitet wurde auch hierbei mit Additiven und zum Vergleich mit Elektroden aus Glassy Carbon.

4.1.1 Charakterisierung der nativen und rekombinanten HRP

Zunächst wurden die verwendeten Peroxidasen hinsichtlich ihrer Glykosilierungsstruktur, Reinheit sowie spezifischen Aktivitäten charakterisiert, um die Grundlagen für einen Vergleich der experimentellen Daten mit den Modellrechnungen zu schaffen.

4.1.1.1 Bestimmung der Proteinmassen der nativen und rekombinanten HRP

Die Auftrennung der gelösten nativen und rekombinanten HRP im SDS-Gradientengel diente zur Ermittlung des Molekulargewichts beider Enzyme sowie der Überprüfung der Reinheit der Chargen (Abb. 4.1 (Gel1)). Das Molekulargewicht kann abgeschätzt werden, indem die bis zu einem bestimmten Zeitpunkt zurückgelegte Distanz eines Proteins im Gel verglichen wird mit der zurückgelegten Distanz verschiedener Standardproteine bekannter Größe bezogen auf den

Logarithmus der Molekulargewichte [96]. Für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Chargen der rekombinanten HRP aus identischer Quelle ergab sich ein Molekulargewicht von etwa 37.600 kDa, für die native von Biozyme und Boehringer eines von etwa 43.000 kDa ($r = 0,9981$ für LMW-Standard-Kalibration). Beide ermittelten Molekulargewichte korrespondieren mit Daten aus der Literatur (rekombinant: 34.520 [39] bzw. 35.500 [97]; nativ: 42.100 kDa [39] bzw. 44.000 kDa [97]). Eine Anlagerung des bei späteren Untersuchungen als Additiv eingesetzten Polyelektrolyten Gafquat 755N konnte - vermutlich wegen der speziellen Bedingungen bei der Behandlung in diesem SDS-Gel - nicht nachgewiesen werden. Da keine weiteren Banden im Gel sichtbar waren, konnte jeweils von einer reinen Enzymlösung ausgegangen werden.

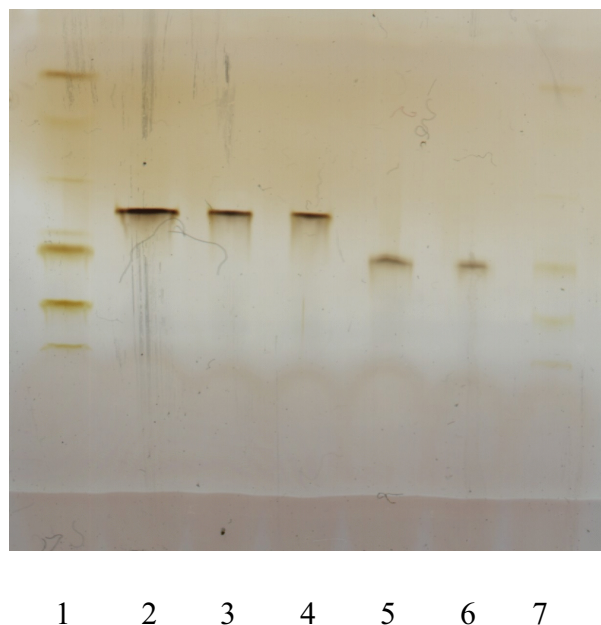


Abb. 4.1 (Gel 1): Auftragung rekombinanter und nativer Peroxidase aus Meerrettich (HRP) (Spur 1 und 7: LMW-Standard; Spur 2: HRP_{rec} (Charge 1); Spur 3: HRP_{rec} (Charge 2); Spur 4: HRP_{rec} (Charge 2), mit Gafquat 755N [1:1 w/w]; Spur 5: HRP_{nativ} (Biozyme); Spur 6: HRP_{nativ} (Boehringer), mit Gafquat 755N [1:1 w/w]; Laufrichtung nach oben)

4.1.1.2 Nachweis der Glykosilierungsstruktur der nativen HRP mit Hilfe von deglykosilierenden Enzymen

Proteine aus eukaryontischen Zellen sind oft durch intrazelluläre Prozessierung mit Oligosaccharid-Seitenketten versehen, die eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, dem

Protein-Targeting sowie ihrer Stabilität spielen [98]. Man unterscheidet *O*-verknüpfte (Serin, Threonin) und, wie bei den acht Seitenketten der nativen HRP, die häufiger vorkommenden *N*-verknüpften Glykosilierungen (Asparagin) [98, 39]. Allgemein zeigen diese durch Modifikationen im Golgi-Apparat der Zellen eine große Variabilität, identisch ist jedoch immer ein als Core bezeichnetes Pentasaccharidzentrum aus zwei N-Acetylglucosaminresten sowie drei Mannoseresten am Asparagin [99]. Verzweigungen mit zusätzlichen Mannoseresten ergeben die mannosereiche, die Verzweigung auch mit N-Acetylglucosaminresten sowie variablen Zuckern wie Xylose die sogenannte hybride Struktur. Weist das Protein nur Verzweigungen auf, die nicht ausschließlich aus Mannoseeinheiten aufgebaut sind, spricht man von der komplexen Form, bei der auch ein Fucoserest am inneren N-Acetylglucosaminrest assoziiert sein kann [100].

Proteine mit einer Carbohydrathülle können mit Hilfe von speziellen Enzymen ganz oder teilweise deglykosiliert werden. Angewandt wurde hier die Deglykosilierung von nativer HRP sowie von GOD mit den Enzymen Endoglykosidase H und α -Mannosidase. Während die Endoglykosidase H mannosereiche und einige hybride *N*-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen komplett - abgesehen vom ersten N-Acetylglucosaminrest direkt am Protein - entfernt, auch wenn ein Fucoserest an ebendiesem assoziiert ist, können komplexe Oligosaccharide von der Endoglykosidase H nicht abgespalten werden; die α -Mannosidase verursacht dagegen nur den Verlust jeweiliger endständiger Mannosereste [100].

Ziel dieser Experimente war die Aufklärung der allgemeinen Struktur der Glykosilierung der hier eingesetzten HRP, denn die Glykosilierungsmuster der einzelnen Seitenketten der HRP können sich trotz Isolierung aus dem gleichen Organismus von Batch zu Batch unterscheiden [101]. Für die Simulationen der Wechselwirkungen von nativer HRP mit Additiven in Lösung (siehe Abschnitt 4.1.5.4) ist die Wahl der korrekten Glykosilierungsstruktur bedeutsam, um experimentelle Befunde mit den Simulationen vergleichen zu können. Die Kontrollversuche mit der GOD dienten zum Nachweis der enzymkatalytischen Aktivität der Endoglykosidase H bzw. der α -Mannosidase.

Zunächst findet man den Zerfall der GOD in ihre zwei identischen Untereinheiten unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 4.2 (Gel 2)). Die ermittelte Größe von 79.100 kDa stimmt gut mit der aus der Literatur bekannten von 75.000-90.000 kDa für die Untereinheit überein [102, 103]. Nach Behandlung mit Endoglykosidase H ist die Masse dieser Enzymuntereinheit um ca. 9.800 kDa geringer geworden (Abb. 4.2 (Gel 2): Spur 6/7). Eine kombinierte Behandlung der GOD mit α -Mannosidase und Endoglykosidase H erbrachte wie erwartet keine weitere Verringerung des Molekulargewichts (Gel 3: Spur 7/8), allerdings ist in diesem Größenbereich die Trennschärfe des Gels auch am geringsten.

Die Behandlung der nativen HRP sowohl von Biozyme als auch von Boehringer mit α -Mannosidase resultierte in einer für beide gleich großen Reduktion der Proteingrößen von etwa

44.300 kDa auf etwa 39.800 kDa, hervorgerufen durch die erfolgte Deglykosilierung von Mannoseeinheiten (Abb. 4.2 (Gel 2): Spur 1-5). Dagegen erbrachte die Behandlung der HRP (Biozyme) mit Endoglykosidase H keine Veränderung der zurückgelegten Distanz im Gel und damit der Proteingröße (Abb. 4.3 (Gel 3): Spur 2/5).

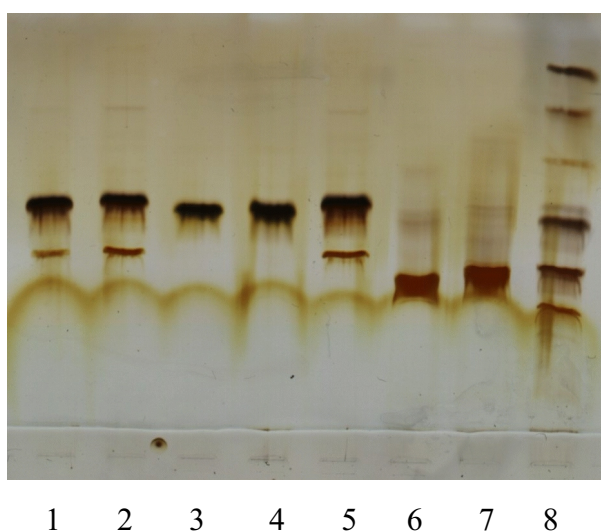


Abb. 4.2 (Gel 2): Auftragung nativer HRP und GOD

(Spur 1: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 3 μL α -Mannosidase; Spur 2: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 12 μL α -Mannosidase; Spur 3: HRP_{nativ} (Biozyme); Spur 4: HRP_{nativ} Boehringer; Spur 5: HRP_{nativ} (Boehringer) mit 6 μL α -Mannosidase; Spur 6: GOD; Spur 7: GOD mit Endoglykosidase H; Spur 8: LMW-Standard; Laufrichtung nach oben)

Die erhaltenen SDS-Gradientengele (Gel 2 und Gel 3) zeigen durch den Kreuzvergleich der unterschiedlich behandelten HRP und GOD, daß beide zur Deglykosilierung eingesetzten Enzyme katalytisch aktiv waren. Das Glykosilierungsmuster der nativen HRP aus beiden Quellen muß aufgrund der erhaltenen Resultate - zumindest überwiegend - dem komplexen Typ entsprechen, da andernfalls die ausschließliche Behandlung mit Endoglykosidase H zu einer merklichen Abnahme der Proteingröße der HRP hätte führen müssen. Eine solche Struktur entspricht auch derjenigen, die bei bisherigen Untersuchungen häufig bei Peroxidasen gefunden wurde, insbesondere bei dem Isoenzym C der HRP [104]. Der spezifische Nachweis mit Antikörpern an HRP aus anderer Quelle (Sigma) ist ebenfalls gezeigt worden [105]. Die hier ermittelte Proteingröße von etwa 44.300 kDa für die native HRP weicht leicht in der in Abschnitt 4.1.1.1. ermittelten ab (43.000 kDa), was vermutlich durch die begrenzte Auflösung der Laufstrecken im Gel zu erklären ist. Die Abnahme des Molekulargewichtes infolge der Behandlung mit α -Mannosidase um 4.500 kDa entspricht tatsächlich einer Deglykosilierung von

ungefähr 24 Mannoseeinheiten der acht Zuckerseitenketten der HRP, was bei einer komplexen Struktur der Glykosilierung auch zu erwarten ist. Die rechnerischen Simulationen können sich aufgrund dieser Resultate auf die Glykosilierungsstruktur aus den Literaturquellen [87, 89] beziehen, denn die dort beschriebene Kohlenhydrathülle entspricht der der hier verwendeten nativen HRP.

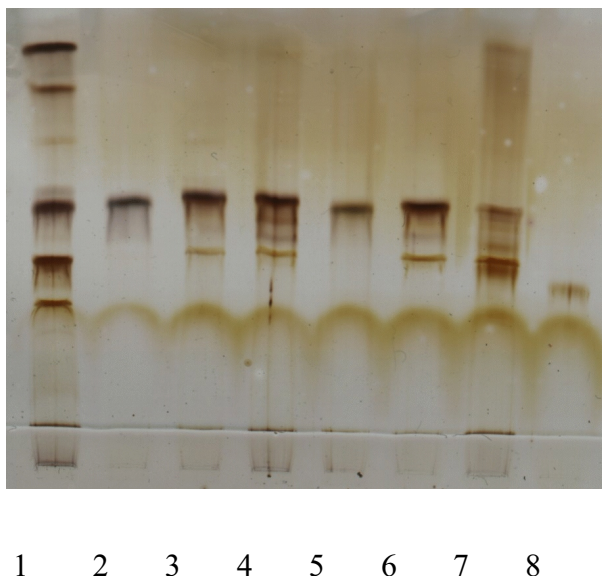


Abb. 4.3 (Gel 3): Auftragung nativer HRP und GOD

(Spur 1: LMW-Standard; Spur 2: HRP_{nativ} (Biozyme); Spur 3: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 12 μ L α -Mannosidase; Spur 4: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 12 μ L α -Mannosidase und 10 μ L Endoglykosidase H; Spur 5: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 10 μ L Endoglykosidase H; Spur 6: HRP_{nativ} (Biozyme) mit 12 μ L α -Mannosidase und 20 μ L Endoglykosidase H; Spur 7: GOD mit 12 μ L α -Mannosidase und 10 μ L Endoglykosidase H; Spur 8: GOD; Laufrichtung nach oben)

4.1.1.3 Bestimmung der Proteingrößen der nativen und partiell deglykosilierten HRP durch Light-Scattering

Die (durchschnittliche) Proteingröße der nativen sowie mit α -Mannosidase partiell deglykosilierten HRP betrug etwa 2,8 nm, die Messungen zeigten keinen Größenunterschied. Aufgrund der (modellhaft berechneten) ellipsoiden 3-D-Gestalt dieses Enzyms ist dieser ermittelte Wert nur als Annäherung zu verstehen. Eine Verringerung des Enzymdurchmessers durch den Verlust der endständigen Mannoseeinheiten konnte demzufolge nicht nachgewiesen werden. Dies konnte aber nicht zu der Aussage führen, die Kohlenhydratseitenketten hätten eng

an der Proteinhülle angelegen und nicht von dieser abgewandt in die Lösung gewiesen, so daß die nun fehlenden Mannosereste den Durchmesser kaum merklich erniedrigt hätten. Dafür war die Auflösung des Gerätes unter Berücksichtigung des Massenanteils der Mannosereste an der Gesamtmasse des Proteins zu gering, zumal die Packungsdichte von sterisch in die Lösung ragenden Seitenketten deutlich geringer sein muß als im Protein an sich. In diesem Falle ist der tatsächlich resultierende Proteindurchmesser einschließlich der Kohlenhydratseitenketten mit dieser Meßmethode wohl kaum exakt zu bestimmen.

4.1.2 Untersuchungen mit nativer HRP in Lösung

4.1.2.1 Aktivitätsbestimmung gelöster HRP

Die Aktivitäten der gelösten nativen und rekombinanten HRP in Lösung wurden mit der TMB-Farbreaktion bestimmt [83], die enzymatische Aktivität wird hierbei durch die Quantifizierung des entstehenden Farbstoffes ermittelt. Zunächst wurde mit einer Verdünnungsreihe nativer HRP (Boehringer, Gr. 2; Acetat-Puffer pH 5,5) zeitabhängig der Proteingehalt ermittelt, mit dem eine Aktivitätsmessung im linearen Bereich des ELISA-Readers als optischem Detektionsgerät möglich war (Abb. 4.4) und der somit als Standard dienen konnte.

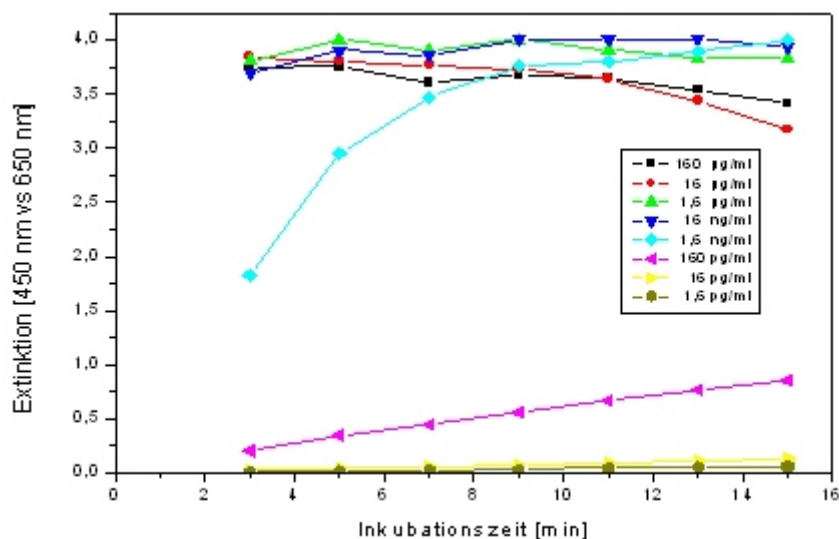


Abb. 4.4: Extinktion bei unterschiedlichen HRP-Gehalten (Boehringer) für verschiedene Inkubationszeiten mit den HRP-Substraten TMB und H_2O_2

Bis zu einer Dauer von 15 Minuten war praktisch keine Aktivitätsabnahme feststellbar, da sich die Steigung der sich ergebenden Meßwerte kaum änderte ($r = 0,9977$ für 160 pg/mL). Unter diesen Testbedingungen war das Enzym also stabil, der Ansatz somit geeignet zur Aktivitätsbestimmung. Als Standardreaktionszeit wurde eine Dauer von zehn Minuten gewählt, die ausgewerteten Extinktionen der in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse lagen immer unter einem Wert von 2.

Die spezifische Aktivität der hauptsächlich verwendeten HRP von Biozyme unterschied sich nur geringfügig von der der Boehringer-HRP (1,15fach höher), die der rekombinanten HRP betrug etwa 70 % der nativen HRP von Biozyme.

4.1.2.2 Temperaturstabilität der nativen HRP

Proteine unterliegen bei höheren Temperaturen einer beschleunigten Denaturierung. Die Ursache ist hauptsächlich eine erleichterte, doch reversible Auffaltung aus der normalerweise kompakten Konformation und ein folgender, irreversibler Verlust der 3-D-Struktur [43, 106]. Soll die Langzeitstabilität eines bestimmten Proteins untersucht werden, so muß die Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur dieser Konformation gewählt werden. Für die native HRP wurde die Schmelzkurve in zwei verschiedenen Puffersystemen (Tris und KPi, jeweils 0,1 M und pH 7,5) ermittelt, wobei in Kontrollansätzen als Chelatbildner EDTA (20 mM) zugegeben wurde, um aus der aufgefalteten HRP abgegebene Calcium-Ionen abzufangen und so eine eventuelle Renaturierung („Refolding“) zu verhindern. Ohne freie Calcium-Ionen ist eine korrekte Faltung der Tertiärstruktur zur aktiven Form der HRP nicht möglich [107]. In einer Versuchsreihe wurden die HRP-Lösungen kontinuierlich erwärmt und die Proben zur Aktivitätsbestimmung sofort nach Erreichen der gewünschten Temperatur entnommen (Abb. 4.5), in einer anderen erst, nachdem die Temperatur durch Erwärmung erreicht und für zehn Minuten lang konstant gehalten worden war (Abb. 4.6). Die entnommenen Proben waren zweimal je 1:50 in Acetat-Puffer (20 mM EDTA) verdünnt und anschließend der Aktivitätstest bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Die Abnahme der enzymatischen Aktivität wurde als fortschreitende Denaturierung gewertet.

Bei Probenahme sofort nach Erreichen der jeweiligen Temperatur bei kontinuierlicher Erwärmung war zwischen 20°C und 30°C ein signifikanter Verlust der Aktivität festzustellen, gefolgt von einer langsameren Abnahme bis 45°C und einem ab 50°C beschleunigten Aktivitätsverlust (Abb. 4.5). Dieser Verlust war bei Probenahme nach zehnminütiger Inkubation bei Temperaturen oberhalb von 40°C deutlich erhöht, der Aktivitätsabfall zwischen 20°C und 30°C wurde hier allerdings nicht erhalten (Abb. 4.6).

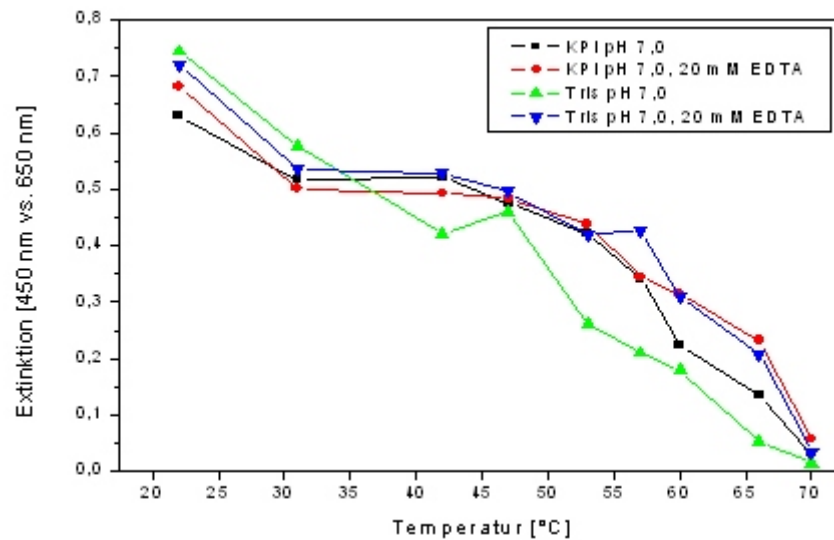


Abb. 4.5: Aktivitäten der nativen HRP bei der angegebenen Temperatur während des Erwärmens

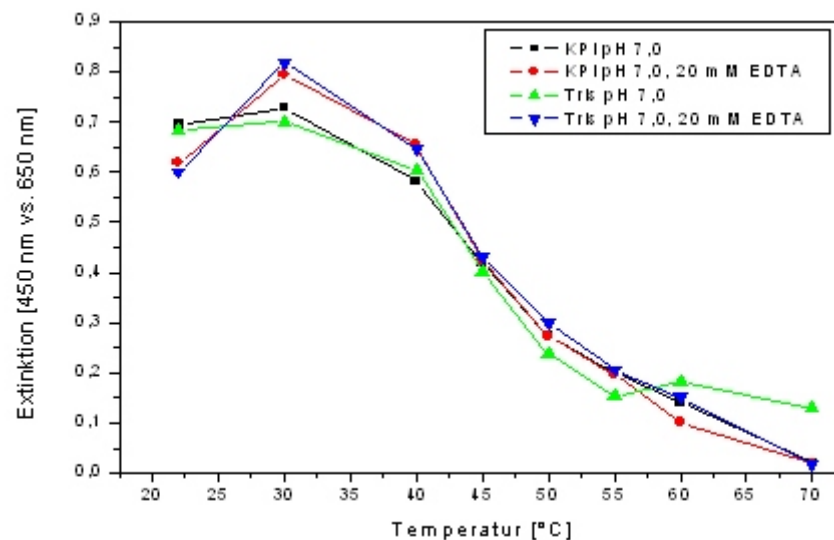


Abb. 4.6: Aktivitäten der nativen HRP nach jeweils zehnmünütiger Inkubation bei der angegebenen Temperatur (Temperatur wurde beim Erwärmen der Enzymlösungen bei den angegebenen Werten für 10 Minuten konstant gehalten)

Es ergab sich hier für alle Ansätze die sigmoide Form einer Schmelzkurve, die die Auffaltung der nativen HRP bei Temperaturen oberhalb von 40°C belegt. Dies steht in sehr guter

Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Resultaten von CD(circular dichroism)-Messungen [108], bei denen in Abhängigkeit von der Temperatur die Drehung des Lichts einer bestimmten Wellenlänge in einer Enzymlösung den Helixanteil der HRP wiedergibt. Bei den dortigen Messungen hatte sich ein allmählicher Verlust der Helixstruktur bei Temperaturen oberhalb von 40°C gezeigt. Ebenso korrespondieren die erhaltenen Schmelzkurven mit analogen Untersuchungen von Temperatureinflüssen [97]. Ein Effekt durch die Beigabe von EDTA im temperierten Ansatz ist nicht ersichtlich, eine Rückfaltung hatte in erkennbarem Umfang also auch beim Ansatz ohne EDTA nicht stattgefunden. Möglicherweise war dies schon durch die starken Verdünnungen und das zügige Arbeiten verhindert worden, eventuell ist der transiente, noch reversible Zustand der HRP vor der irreversiblen Denaturierung auch nur von sehr kurzer Dauer. Die leicht erhöhten Ausgangsaktivitäten bei sofortiger Probenahme waren gleich nach Ansetzen der Lösungen gemessen worden und sind offensichtlich darin begründet, daß frischgelöste HRP in einem kurzen Zeitraum einen bestimmten Aktivitätsverlust erleidet.

4.1.2.3 Langzeitstabilität gelöster nativer HRP

Die Lagerstabilität von in wäßriger Lösung gelagerter nativer HRP (Biozyme) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 20°C, 37°C und 57°C) untersucht, die Ansätze wurden sämtlich unter Lichtabschluß temperiert. Als Additive wurden mit Polyethylenimin, Polylysin, Gafquat 755N sowie DEAE-Dextran Makromoleküle eingesetzt, die auch als Zusatz in der UV-Pastenmatrix bzw. in der zu fixierenden Proteinschicht auf den Dickschicht-Sensoren Verwendung fanden. Ihre Molekülgröße, gepaart mit Verzweigungen, macht ihren Verlust durch Auswaschung aus der Pastenmatrix im späteren Biosensor unwahrscheinlich. Die Massenanteile von Enzym (250 ng HRP / mL) und den Additiven (je 1 % w/v) waren in den temperierten Lösungen identisch. Die Ansätze wurden praktisch zeitgleich bei Raumtemperatur hergestellt, um einen - jeweils unterschiedlich hohen - Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms bei der Herstellung der Ansätze zu vermeiden. Verwendet wurde dabei nur eine einzige Enzymlösung, deren Aliquotierung in die verschiedenen Additivlösungen zügig durchgeführt wurde. Nach Messung der Anfangsaktivitäten (der entsprechend verdünnten Proben) wurde mit der Temperierung der einzelnen Ansätze begonnen. Der starke pH-Shift der Polyethyleniminlösung war vorher neutralisiert worden, um pH 7 wie in den anderen Lösungen zu erreichen.

Zunächst fällt auf, daß die anfängliche Aktivität bei allen Ansätzen mit Additiven höher war als bei Verzicht auf einen Zusatz (Abb. 4.7-4.10). Am höchsten war die Ausgangsaktivität bei der Verwendung von Gafquat 755N (ca. 1,7fach erhöht). Die Ursache für diesen Befund kann eine Aktivierung der HRP sein, da die Vereinigung der verschiedenen Additivlösungen mit Aliquots

einer einzigen Enzymlösung praktisch zeitgleich erfolgte. Eine mögliche Verlangsamung des Verlustes an enzymatischer Aktivität beim Lösen der HRP kann nicht als Erklärung dienen, da eine einzige Enzymlösung aliquotiert worden war, die HRP sich also schon vor der Vereinigung mit den Additiven für einige Minuten in Lösung befand. Es ist auch möglich, daß ein Anhaften der Enzyme an der Gefäßwand durch die Gabe der Polyelektrolyten erschwert wird. Die native HRP könnte durch ihre bei neutralen pH-Werten nur schwach geladene Proteinoberfläche an unpolaren Gefäßwänden wie den hier verwendeten Kunststoff-Behältern (Eppendorfgefäße als Laborstandard) haften. Eine dadurch resultierende Änderung der Proteinkonformation könnte die katalytische Aktivität reduzieren. Auch ist bei an den Wandungen haftenden Proteinen sicher schon allein aus Gründen des Stofftransports die maximale Umsatzgeschwindigkeit dieser Enzyme erniedrigt, was bei der HRP mit ihrem hohen Turnover, also sehr hohem Substratumsatz, entscheidend sein kann. Der Zusatz eines Polyelektrolyten kann das Anhaften verhindern, indem die Grenzfläche Lösung-Gefäßwand in ihren Eigenschaften verändert wird oder auch die Enzyme durch die Wechselwirkung mit diesen stärker in Lösung gehalten werden. Dafür spricht, daß das starke Detergens Gafquat 755N auch den stärksten Aktivierungseffekt zeigt.

Untersuchungen mit Glasgefäßen hatten ebenfalls Abnahmen der katalytischen Aktivitäten der nativen HRP in vergleichbarer Größenordnung, wenn auch etwas weniger stark, ergeben (nicht gezeigt). Oberflächeneffekte können bei diesem Material allerdings ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da je nach Herstellungsprozeß Gläser mit leicht unterschiedlichen Kompositionen, und damit Oberflächeneigenschaften, resultieren.

Die gemessenen enzymatischen Aktivitäten bei 4°C, 20°C sowie 37°C zeigen, daß der Verlust der Aktivität mit höherer Temperatur schneller fortschritt. Diese Temperaturen liegen sämtlich unterhalb der Schmelztemperatur der nativen HRP, die Kurven spiegeln also die Lagerstabilität des nativ gefalteten Proteins unter diesen Bedingungen wieder. Gemessen an den Anfangsaktivitäten der verschiedenen Ansätze war die Tendenz der Aktivitätseinbußen im Grunde gleich. Auffallend ist insbesondere bei den bei 4°C sowie 20 °C temperierten Lösungen, daß innerhalb von 24 Stunden ein relativ starker Abfall der Aktivität zu beobachten ist, gefolgt von einem je nach Temperatur unterschiedlich schnellem, im Grunde hyperbolischen Abfall über den weiteren Lagerzeitraum. Die Geschwindigkeit der Aktivitätsabnahme ist nach dem ersten, starken Verlust der Aktivität erheblich verlangsamt. Dies spricht für zwei unterschiedliche Mechanismen bei der Inaktivierung der HRP, so beispielsweise anfänglich starker Aktivitätsverlust durch Verlust von Calcium-Ionen (eher unwahrscheinlich) oder auch Anhaftung an die Gefäßwandung bis zur Einstellung des entsprechenden Gleichgewichtes, gefolgt von einem allmählichen Verlust der Enzymaktivität durch langsame Auffaltung mit nachgeschalteter Denaturierung. Letzteres ist bei tieferen Temperaturen mit geringerer

Geschwindigkeit zu erwarten, wie es auch bei den hier vorliegenden Resultaten zu beobachten ist. Die Aktivität der HRP bei 4°C zeigt bei allen Additiven mit Ausnahme von Polyethylenimin einen gleichmäßigen, geringen Abfall. Bei diesem Additiv ist die Ursache vermutlich in lokalen pH-Unterschieden zu suchen, die bei diesem starken Polyelektrolyten kaum vermeidbar waren. Bei den höheren Temperaturen wirkte sich auch DEAE-Dextran deaktivierend aus.

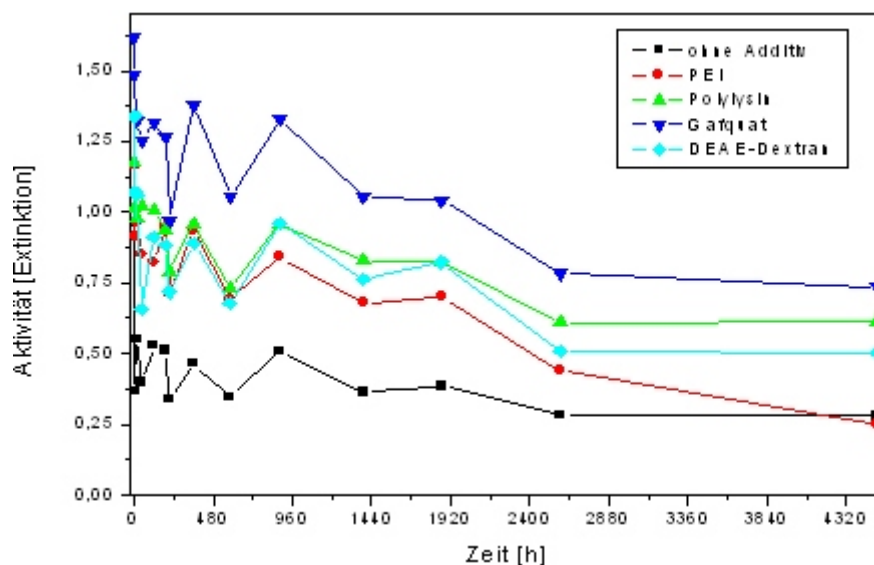


Abb. 4.7: Lagerstabilität von nativer HRP mit Polyelektrolyten in Lösung bei 4°C

Erwartungsgemäß war die enzymatische Aktivität bei Lagerung bei 57°C im Vergleich zu den bei niedrigeren Temperaturen gelagerten Ansätzen deutlich reduziert. Innerhalb von etwa 48 Stunden betrug sie in allen Ansätzen ca. 10% (Polylysin) oder noch deutlich weniger der Ausgangsaktivität. Da diese Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur der nativen HRP lag (siehe Abschnitt 4.1.2.2), kann der schnelle Verlust der Aktivität im Vergleich zu den niedrigeren Temperaturen durch die völlige Auffaltung und anschließende schnellere Denaturierung erklärt werden. Ein aktivitätserhaltender Effekt bei dieser Temperatur durch Polylysin und Gafquat 755N ist nicht erkennbar, da der Aktivitätsabfall über die Zeit - bezogen auf die jeweilige Ausgangsaktivität - in etwa dem bei Verzicht auf Additive entsprach. Dagegen wirkten sich DEAE-Dextran und Polyethylenimin (wie auch bei 20°C und 37°C) eindeutig negativ aus, die Aktivität sank hierbei sehr viel schneller.

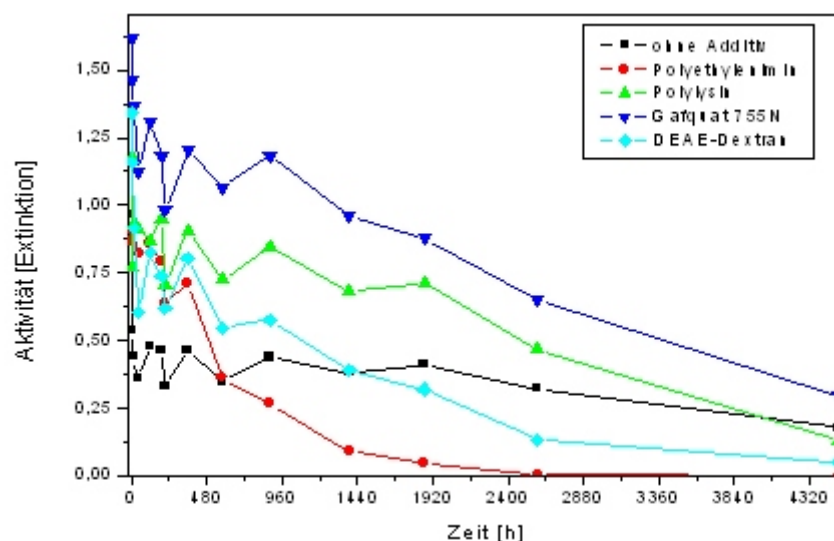


Abb. 4.8: Lagerstabilität von nativer HRP mit Polyelektrolyten in Lösung bei 20°C

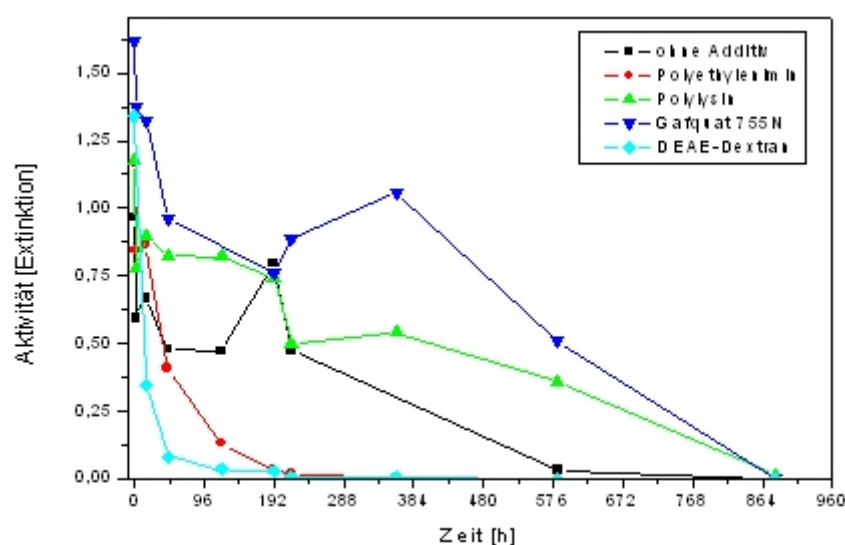


Abb. 4.9: Lagerstabilität von nativer HRP mit Polyelektrolyten in Lösung bei 37°C

Insgesamt bleibt als Resultat der hier durchgeführten Untersuchungen, daß die Aktivität der nativen HRP in Lösung durch die hier zugegebenen Polyelektrolyte gesteigert werden kann. Auf eine echte Stabilisierung der katalytischen Aktivität bezogen auf die jeweiligen Anfangsaktivitäten kann nicht geschlossen werden, auch wenn die Additive Polylysin und Gafquat 755N einen tendenziell positiven Einfluß bezüglich der Lagerstabilität erkennen lassen (Abb. 4.11).

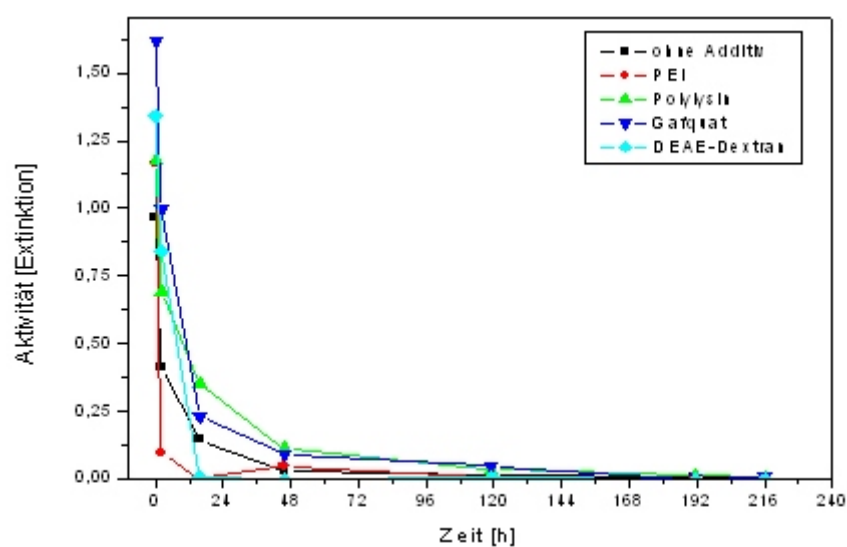


Abb. 4.10: Lagerstabilität von nativer HRP mit Polyelektrolyten in Lösung bei 57°C

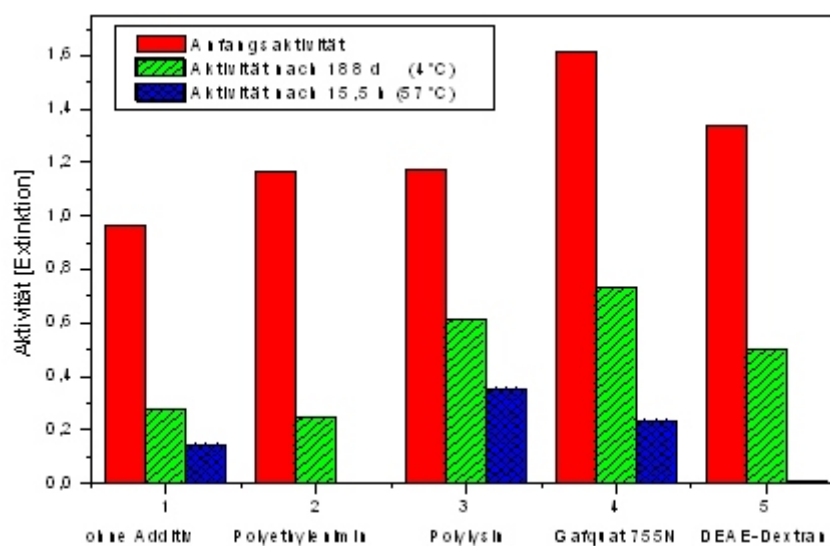


Abb. 4.11: Aktivität von nativer HRP mit Additiven nach unterschiedlichen Lagerzeiten bei verschiedenen Temperaturen

4.1.3 Untersuchungen mit Graphit-Dickschicht-Elektroden zum elektrochemischen Umsatz von Substrat und Mediator

4.1.3.1 Potentialüberprüfung der verwendeten Referenzelektroden

Beim Einsatz von (Pseudo-)Referenzelektroden aus verschiedenen Materialien muß die auftretende Potentialverschiebung in einer Lösung relativ zum Referenzpotential etablierter Bezugselektroden bekannt sein, um ein vergleichbares Potential an der Arbeitselektrode zu gewährleisten. Zur Ermittlung dieser Verschiebung wurden zyklische Voltamogramme in einer Hydrochinonlösung (2,0 mM Hydrochinon in 0,1 M KPi-Puffer pH 7,0) durchgeführt, wobei als Referenzelektrode im Wechsel eine Ag/AgCl-Glaselektrode, eine gedruckte Gold- (Trace) sowie eine gedruckte Platin-Dickschicht-Elektrode (GBF) verwendet wurde. Eine Graphit-Dickschicht-Elektrode (Elektrodag 423-SS; Trace) diente als Arbeitselektrode.

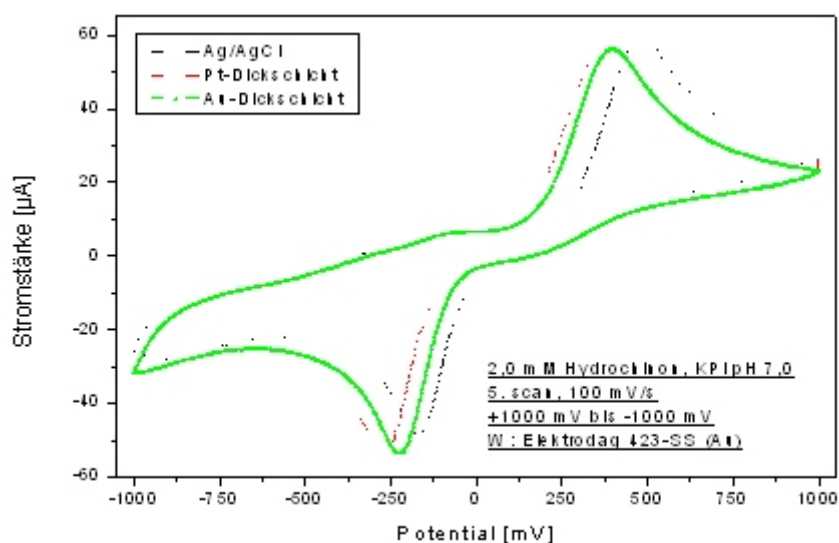


Abb 4.12: Potentialabweichungen der Dickschicht-Referenzelektroden relativ zur Ag/AgCl-Referenzelektrode

Eindeutig zu erkennen sind die Stromwellen der Hydrochinon-Oxidation im positiven sowie der para-Benzochinon-Reduktion im negativen Potentialbereich (Abb. 4.12). Die Stromstärkemaxima der Reduktionsströme lagen mit der gewählten scan-Geschwindigkeit von 100 mV/s bei -170 mV (Ag/AgCl), -224 mV (Au-DS; Trace) und -272 mV (Pt-DS; GBF), so daß die Verschiebungen des Referenzpotentials relativ zur Ag/AgCl-Elektrode 54 mV (Au-DS; Trace) und 102 mV (Pt-DS; GBF) in den kathodischen Bereich betrugen. Eine Überprüfung

dieser Bezugspotentiale bei der Verwendung verschiedener Chargen solcher Elektroden ist angeraten, so war bei einer früheren Untersuchung beispielsweise für den Potentialshift der Platin-Dickschicht ein Wert von ca. 200 mV ermittelt worden [62]. Die zweite verwendete Ag/AgCl-Elektrode zeigte keine Abweichungen zur bei dieser Messung eingesetzten.

4.1.3.2 Reduktion von H_2O_2 an Graphit-Dickschicht-Elektroden

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Sensoren in bezug auf die Reduktion von Wasserstoffperoxid als natürlichem Substrat der Peroxidasen wurden je fünf Graphit-Dickschicht-Sensoren von Trace (Elektrodag 423-SS) bzw. der GBF (Elektrodag 421-SS) im Batch getestet. Bei beiden Sensortypen war die Graphitschicht auf eine Gold-Dickschicht aufgedruckt. Die Graphitelektroden wurden gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode mit -100 mV polarisiert, wobei 0,1 M KPi-Puffer (pH 7,0) die Vorlage bildete. Sukzessiv wurde durch Zugabe eines vernachlässigbar kleinen Volumens konzentrierter H_2O_2 -Lösung der Wasserstoffperoxidgehalt erhöht und der sich ergebende Stromfluß ermittelt.

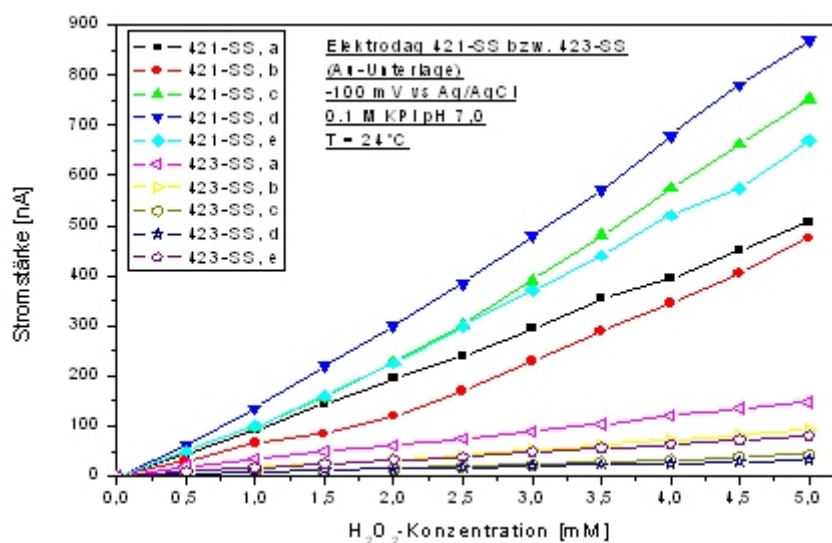


Abb. 4.13: Resultierende Stromstärken für die Elektrodag 421-SS - bzw. 423-SS - Elektroden bei unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen, die Indices a-e bezeichnen je 5 verschiedene Elektroden

Für beide Sensortypen ergab sich eine Linearität bis zur höchsten gemessenen H_2O_2 -Konzentration von 5 mM (Abb. 4.13), wobei sich die resultierenden Stromflüsse von Sensor zu Sensor stark unterschieden. Die durchschnittliche Empfindlichkeit der Elektrodag 423-SS -

Elektroden betrug etwa $2,2 \text{ nA/mm}^2$ ($\pm 52 \%$), die Sensitivität der Elektrode 421-SS - Elektroden war mit durchschnittlich 27 nA/mm^2 ($\pm 24 \%$) um eine Größenordnung höher (jeweils bezogen auf $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$).

4.1.3.3 Mediatorumsetzung an Graphit-Dickschicht-Elektroden

Zur Ermittlung des geeigneten bzw. erforderlichen Potentials zur Mediatorumsetzung an den verwendeten Dickschicht-Elektroden wurden mit einer Elektrode 423-SS - Elektrode im Becherglas zyklische Voltamogramme aufgenommen, die Vorlage bildete KPi-Puffer ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 7,0$) mit darin gelöstem Hydrochinon [$2,0 \text{ mM}$]. Die erhaltenen zyklischen Voltamogramme zeigen die Stromwellen für die Oxidation des Hydrochinons mit dem Maximum bei etwa $+350 \text{ mV}$ und Reduktion des para-Benzochinons bei etwa -175 mV (für 100 mV/s), die sich praktisch nicht überlappen (Abb. 4.14).

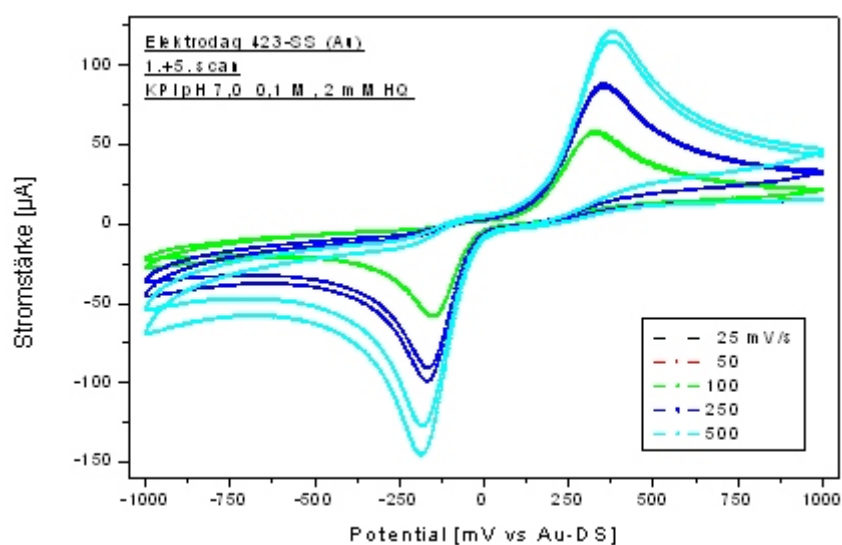


Abb. 4.14: Zyklische Voltamogramme mit einer Elektrode 423-SS Dickschicht-Elektrode in Hydrochinon-Lösung (Gold-Dickschicht als Referenz; in KPi $\text{pH } 7,5$)

Die Strommaxima weisen damit auch bei der niedrigsten untersuchten Scan-Geschwindigkeit von 25 mV/s mit über 400 mV einen Abstand von deutlich mehr als 57 mV auf. Der Umsatz dieses Redoxpaares an diesem Elektrodentyp entspricht daher einer irreversiblen Reaktion, der Ladungsdurchtritt ist also gehemmt [57]. Auch belegt die geringe Verschiebung der Maxima bei Erhöhung der Scan-Geschwindigkeit bis zu etwa 500 mV/s , daß der Diffusionseinfluß auf den Umsatz des Mediators in seinem jeweiligen Redoxzustand nicht geschwindigkeitsbestimmend

ist, sondern der Umsatz einer Durchtrittskontrolle unterliegt. Die Abweichung von ca. 50 mV der Lage des Strommaximums für die Hydrochinon-Oxidation zur Messung in Abbildung 4.12 ist vermutlich in leicht differierenden Meßbedingungen wie z.B. der Rührerdrehzahl begründet. Außerdem wurden zyklische Voltamogramme in einer Hydrochinon-Lösung [2,0 mM] durchgeführt, um anhand der sich ergebenden Stromflüsse die Reproduzierbarkeit der Sensorherstellung in bezug auf die Mediatorumsetzung abzuschätzen. Erhalten wurden für alle Sensoren klassische Stromwellen für die Oxidation und Reduktion des Mediators in seinem jeweiligen Redoxzustand (Abb. 4.15).

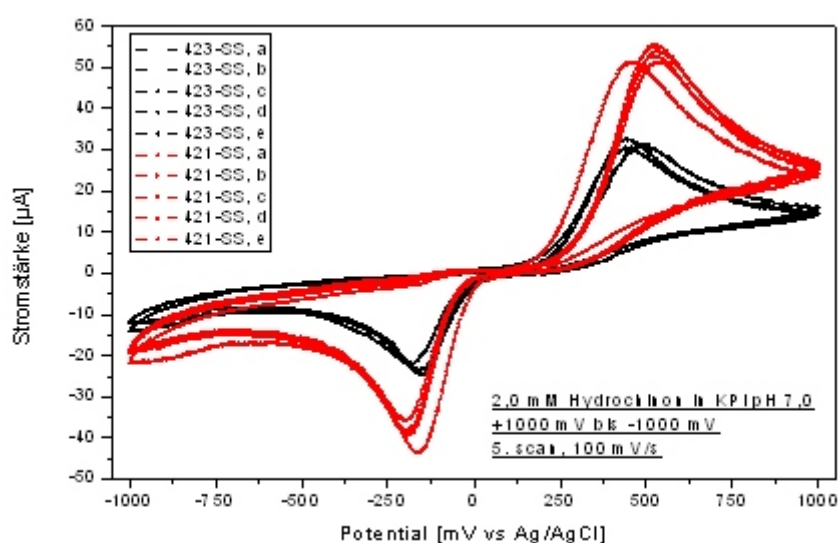


Abb. 4.15: Zyklische Voltamogramme von Elektrodag-Elektroden in Hydrochinon-Lösung

Hinsichtlich der Lage des Strommaximums der para-Benzochinon-Reduktion zeigten sich in den Voltamogrammen generell nur geringe Abweichungen für die beiden jeweiligen Sensortypen, wie auch bei der Stromwelle für die Hydrochinon-Oxidation. Wie auch bei den amperometrischen Messungen bei der H_2O_2 -Reduktion in Abschnitt 4.1.3.2 erbrachten die Elektrodag 421-SS - Dickschicht-Elektroden deutlich höhere Ströme, trotz geringerer Oberfläche der Arbeitselektrode. Die durchschnittliche Stromstärke im Scheitelpunkt der Mediator-Oxidation betrug für Elektrodag 421-SS $10,6 \mu\text{A}/\text{mm}^2$, für Elektrodag 423-SS $4,4 \mu\text{A}/\text{mm}^2$. Offensichtlich ist diese ausgehärtete Paste insgesamt elektrochemisch aktiver als Elektrodag 423-SS.

4.1.4 Untersuchungen mit Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektroden

4.1.4.1 Nachweis enzymatischer Aktivität in Lösung an einer Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit Hydrochinon durch zyklische Voltametrie

Peroxidaseaktivität in Lösung wurde mit zyklischer Voltametrie an einer unbeschichteten Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode nachgewiesen. Mit einer Scan-Geschwindigkeit von 100 mV/s wurden nacheinander zyklische Voltamogramme in Hydrochinon-Lösung [5 mM], dann nach Addition von Wasserstoffperoxid [5 mM] und - gleich anschließend an diese Messung - nach Zugabe von HRP [0,1 mg/ml] in KPi-Puffer (0,1 M, pH 7,0) aufgenommen (Abb. 4.16).

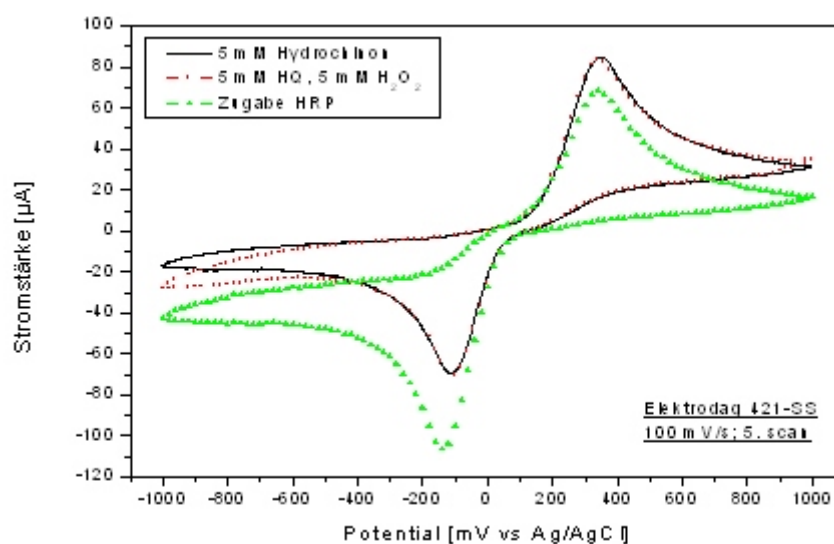


Abb. 4.16: Nachweis von Peroxidaseaktivität im zyklischen Voltammogramm

Zu erkennen sind die beiden charakteristischen Stromwellen für Hydrochinon- bzw. para-Benzochinon-Umsatz im Falle der Mediator-Lösung. Der Verlauf des zyklischen Voltamogramms ist nach Addition des Substrats H_2O_2 im wesentlichen deckungsgleich, eine Beeinflussung des Umsatzes des Mediators in seinen beiden Redoxzuständen durch Wasserstoffperoxid ist also nicht gegeben. Der Umsatz von H_2O_2 an der Elektrode ist außerdem in einem weiten Potentialbereich erheblich geringer als der des Mediators bzw. nicht nachweisbar. Nur bei negativer Polarisierung ab etwa -400 mV vs. Ag/AgCl ist der kathodische Stromfluß, abseits der Stromwellen für die Mediatorumsetzung, erhöht, was seine Ursache in der Reduktion des Wasserstoffperoxids an der Elektrodenfläche hat. Die Zugabe der HRP beeinflusste das zyklische Voltammogramm jedoch entscheidend, denn der kathodische Stromfluß

für die Umsetzung von para-Benzochinon erhöhte sich deutlich. Der anodische Stromfluß für die Umsetzung des Hydrochinons dagegen sank. Dies zeigt die enzymatische Aktivität der gelösten HRP, die nach der Reaktion mit dem Substrat H_2O_2 durch Hydrochinon rereduziert wurde. Das dadurch zusätzlich entstandene para-Benzochinon reagierte an der Graphitoberfläche ab, entsprechend erhöhte sich der Stromfluß der kathodischen Stromwelle. Die Konzentration an Hydrochinon sank durch den Verbrauch ab, dementsprechend ist das Maximum der anodischen Stromwelle erniedrigt.

4.1.4.2 Nachweis enzymatischer Aktivität einer mit HRP-Graphit-UV-Pastenmembran mit Hydrochinon durch zyklische Voltametrie

Eine Alternative zum einfachen Einmischen von Enzym in UV-polymerisierbare Paste, die bei GOD-Sensoren als Enzymmembran eingesetzt werden kann, kann das Einbringen von Graphit-Partikeln bieten, auf die in einem vorherigen Schritt Enzyme adsorbiert wurden. Gelänge es, durch einen möglichst hohen Graphitanteil in der Paste nach dem Belichtungsschritt eine leitende Verbindung wenigstens eines Teils der Partikel zur polarisierten Elektroden-Dickschicht zu gewährleisten, könnte so eine poröse Graphitstruktur mit relativ großer Oberfläche nachempfunden werden. Diese ließe die Adsorption vieler einzelner Enzymmoleküle zu, weshalb sich insgesamt ein recht hoher Stromfluß bei Enzymaktivität ergeben sollte. Durch die Wasserdurchlässigkeit der in dieser Arbeit verwendeten UV-Paste sollten die Oberflächen gänzlich zugänglich sein, der Vorteil der Sensorherstellung durch Siebdruck bliebe jedoch erhalten.

Zunächst wurden Graphitpartikel gemörsert, um die Partikelgröße zu reduzieren und so prinzipiell siebdruckfähiges Material zu erhalten. Eine definierte Menge wurde in KPi-Puffer (0,1 M, pH 7,0) suspendiert, in welchem native Peroxidase gelöst war [0,25 mg HRP / ml]. Nach jeweils kurzem Homogenisieren mit Rührstäbchen für etwa fünf Sekunden wurden nach unterschiedlichen Zeiten Aliquots aus dem Überstand entnommen und mit Hilfe der TMB-Reaktion auf Peroxidaseaktivität getestet (Abb. 4.17). Schon nach wenigen Minuten und erstmaligem Rühren war die jeweilige maximale Beladung der Graphitpartikel mit HRP fast erreicht, eine längere Inkubation erbrachte nur eine unwesentliche Erniedrigung der enzymatischen Aktivität im Überstand. Die Höchstbeladung der hier eingesetzten Graphitpartikel konnte mit etwa $5,6 \mu\text{g HRP} / \text{mg Graphit}$ abgeschätzt werden, indem der HRP-Gehalt der Enzymlösung dividiert wurde durch die Masse Graphit, bei der die Restaktivität im Überstand gegen den Wert 0 tendierte. Für die analog durchgeführte Versuchsreihe mit Sigradur-Partikeln, einer speziellen Graphitsorte, ergab sich eine Beladungskapazität von etwa $9,1 \mu\text{g HRP} / \text{mg Sigradur}$ (nicht gezeigt).

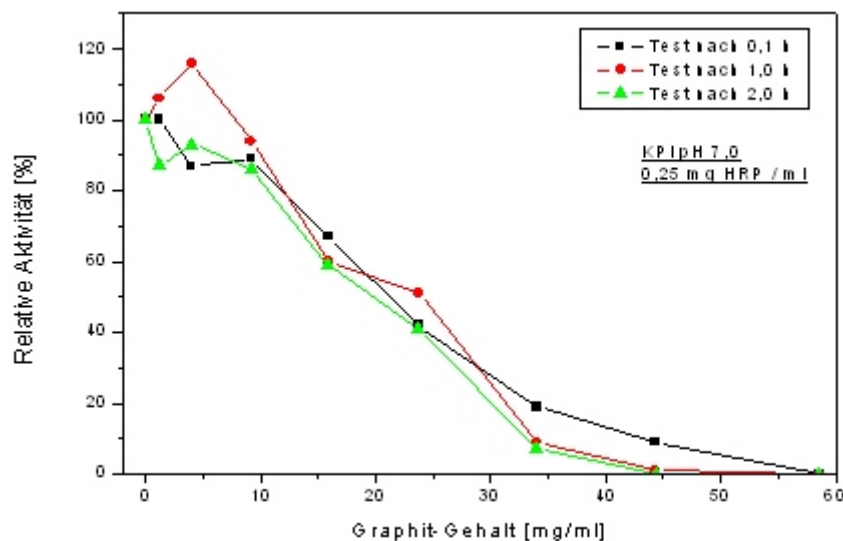


Abb. 4.17: Restaktivität von HRP im Überstand einer mit Graphitpartikeln inkubierten Lösung

Nach Homogenisierung wurde eine bestimmte Menge Graphitsuspension definierter Beladung [$5,6 \mu\text{g HRP} / \text{mg Graphit}$] in UV-Paste eingemischt, so daß sich eine Mischung von annähernd $25 \mu\text{g Graphit}$ in 1 mg UV-Paste ergab. Diese wurde dann auf eine Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode gedruckt. Die mit dieser Elektrode durchgeführten zyklischen Voltammogramme (CV) im Potentialbereich von 0 mV bis -1000 mV vs. Ag/AgCl erfassen den gesamten Bereich der Reduktion des para-Benzochinons (Abb. 4.18). Nach der Messung im KPi-Puffer wurde zunächst Hydrochinon, dann Wasserstoffperoxid in zwei Konzentrationen zugegeben. Das CV nur mit Mediator zeigt, ansonsten dem im Puffer durchgeführten CV deckungsgleich, die überlagerten Stromwellen für den Mediatorumsatz. Nach Addition von H_2O_2 stieg der Stromfluß des Maximums der para-Benzochinon-Umsetzung deutlich an, die Verschiebung des Scheitelpunkts um etwa 50 mV hin zu negativerem Potential entsprach in etwa der bei der blanken Elektrode mit HRP in Lösung. Der Anstieg des Stromflusses für die Oxidation von Hydrochinon ist offensichtlich durch Diffusionseinfluß begründet. Während bei den Untersuchungen mit blanker Elektrode und gelöstem Enzym Hydrochinon gleichmäßig verteilt in der Lösung durch enzymatische Aktivität ständig verbraucht wurde, verhinderte die UV-Pastenmembran ein schnelles Fortdiffundieren des an der Elektrode-Oberfläche elektrochemisch aus dem para-Benzochinon des HRP-Umsatzes gebildeten Hydrochinons. Die Konzentration an para-Benzochinon stieg durch die enzymatische Aktivität an, in unmittelbarer Nähe der Elektrode-Oberfläche innerhalb der Membran war somit die Konzentration sowohl von oxidiertem wie auch reduziertem Mediator höher als in dem umgebenden Puffer. Der leicht angestiegene Stromfluß bei höherer Wasserstoffperoxid-Konzentration erklärt sich vermutlich

durch den erhöhten Umsatz der Peroxidase infolge einer höheren Substratkonzentration, die aber im Sättigungsbereich liegen dürfte. Die leichte Verschiebung des Strommaximums der para-Benzochinon-Reduktion zu negativerem Potential verglichen mit der Messung in Abschnitt 4.1.3.3 erklärt sich vermutlich durch den Einfluß der Pastenmembran als Diffusionsbarriere. HRP-Elektroden mit in der UV-Pastenmatrix integrierten enzybeladenen Graphit-Partikeln sind nach diesen Resultaten prinzipiell ebenso für analytische Zwecke geeignet wie solche, die nur mit Enzympaste bedruckt wurden (siehe Abschnitt 4.1.4.3). Direkter Elektronentransfer war bei diesen Elektroden jedoch weder mit zyklischer Voltametrie noch mit Amperometrie nachweisbar.

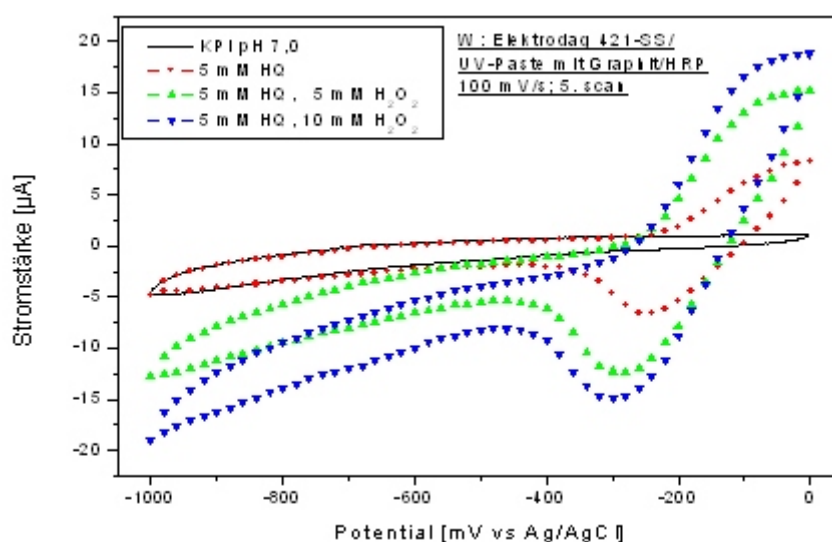


Abb. 4.18: Nachweis von Peroxidase-Aktivität einer mit HRP-beladenem Graphit in UV-Paste beschichteter Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit zyklischer Voltametrie

4.1.4.3 Ermittlung der Sättigungskonzentrationen für das Substrat H_2O_2 und den Mediator Hydrochinon bei HRP-Dickschicht-Elektroden im FIA-System

Für spätere analytische Messungen mit HRP-beschichteten Dickschicht-Elektroden (im FIA-System) müssen der lineare Bereich hinsichtlich des Substrats Wasserstoffperoxid sowie die Sättigungskonzentration des Mediators Hydrochinon bekannt sein. Zur Ermittlung dieser Parameter wurden zwei Graphit-Dickschicht-Elektroden (GBF-Layout) mit UV-Paste bedruckt, in die unterschiedliche HRP-Gehalte eingemischt waren [0,1 bzw. 0,2 μg HRP / mg UV-Paste]. Nach Einbau in ein FIA-System (analog Abschnitt 3.7.4, Fließrate ca. 0,7 ml/min) wurden

unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Wasserstoffperoxid und Hydrochinon coinjiziert und die resultierende Stromstärke bei einem angelegten Potential von -350 mV (vs. Pt-Dickschicht) als peakförmiges Signal detektiert, als Lösungsmittel diente KPi-Puffer (0,1 M, pH 6,5).

Die Messungen mit konstanter, relativ hoher Hydrochinon-Konzentration, jedoch Variation der H_2O_2 -Konzentration, ergaben den Beginn des Sättigungsbereiches hinsichtlich des Substrates ab einer Konzentration von höchstens 0,5 mM (Abb. 4.19). Angegeben sind die sich unter Berücksichtigung der Dispersion ($D = 6$, von Injektionsschleife zum Detektor) an der Elektrodenfläche ergebenden Konzentrationen, gemessen wurde mit der HRP-Elektrode geringerer Enzymbeladung.

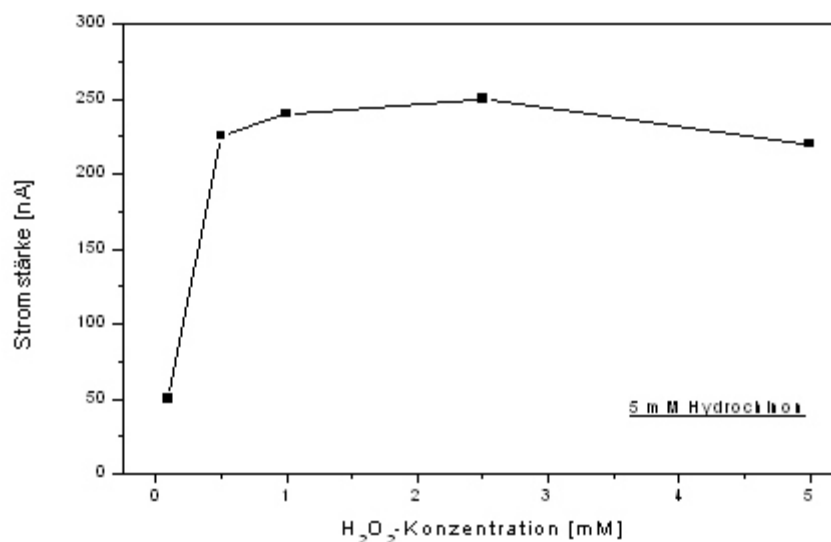


Abb. 4.19: Abhängigkeit der Signalhöhe von der H_2O_2 -Konzentration [5 mM Hydrochinon]; Elektrode beschichtet mit Peroxidase in UV-Paste [0,1 μg HRP / mg UV-Paste]

Die erhaltenen Signalhöhen bei Variation des Hydrochinon-Gehaltes bei jeweils gleichem, relativ hohem H_2O_2 -Gehalt im Sättigungsbereich sind in Abbildung 4.20 für beide Elektroden dargestellt. Der lineare Bereich wird bei den Elektroden ab einer Hydrochinon-Konzentration von 0,5 mM verlassen, die Sättigung ist bei einer Konzentration von 2,5 mM bei beiden Elektroden erreicht.

Der sich in diesem Bereich ergebende Stromfluß ist bei der Elektrode mit doppeltem Enzymgehalt recht genau zweimal so hoch, was belegt, daß tatsächlich die enzymatische Aktivität limitierend ist, und nicht der Stofftransport von Substrat und Mediator in der gedruckten Membran. Die Messungen mit unterschiedlichen Mediatorkonzentrationen waren

also tatsächlich unter Substratsättigung durchgeführt worden, der Stofftransport hinsichtlich H_2O_2 war nicht limitierend. Eine Hemmung des enzymatischen Reaktionszyklus im Bereich höherer Konzentrationen ist für beide Stoffe nicht erkennbar.

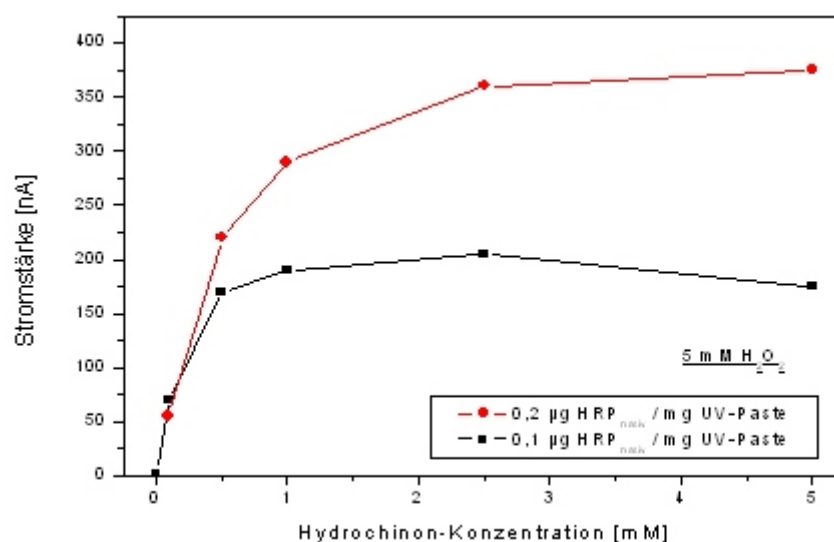


Abb. 4.20: Signalabhängigkeit von der Beladung mit HRP bei Variation der Mediator-Konzentration [5 mM H_2O_2]

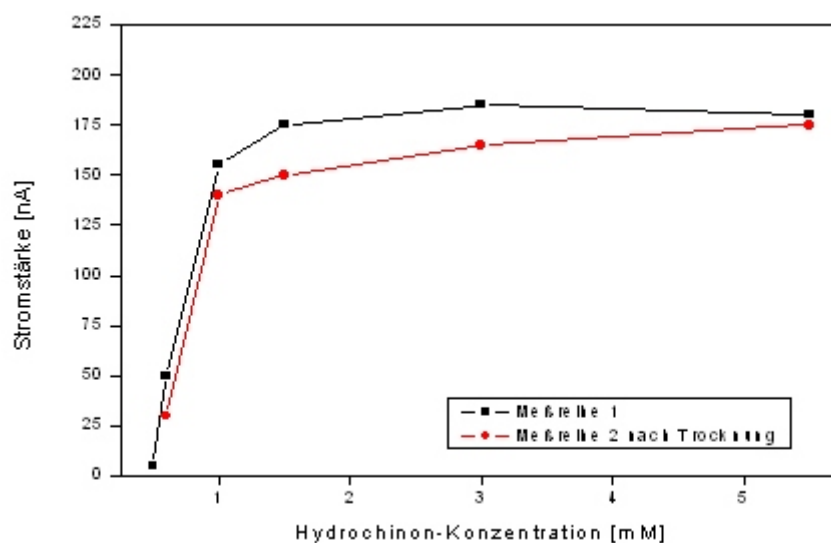


Abb. 4.21: Signalverlust einer HRP-Elektrode durch Trocknung [0,1 µg HRP / mg UV-Paste]

Eine zwischenzeitliche zweistündige Trocknung der Elektrode mit geringerem Enzymgehalt führte nach Wiedereinbau in das FIA-System nur zu einer geringen Aktivitätsabnahme von etwa 10 % (Abb. 4.21). Elektroden, die mit HRP-enthaltender UV-Paste beschichtet sind, können also wie GOD-Elektroden nach Gebrauch getrocknet und später wiederverwendet werden.

4.1.4.4 Arbeitsstabilität von HRP-Elektroden im FIA-System mit Gafquat 755N und Polyethylenimin als Additiv

Die Additive Gafquat 755N sowie Polyethylenimin wurden auch in HRP-Elektroden eingesetzt. Der Enzymgehalt befand sich mit 75 ng HRP_{nat} / mg UV-Paste im Bereich der Signallimitierung durch die HRP im Falle von Substrat- und Mediatorsättigung (in Vorversuchen ermittelt), so daß eine Signalabnahme auf den Verlust von Enzymaktivität schließen ließ. Der Additivgehalt in den Pastenmischungen betrug 5 % w/w bezogen auf die UV-Paste.

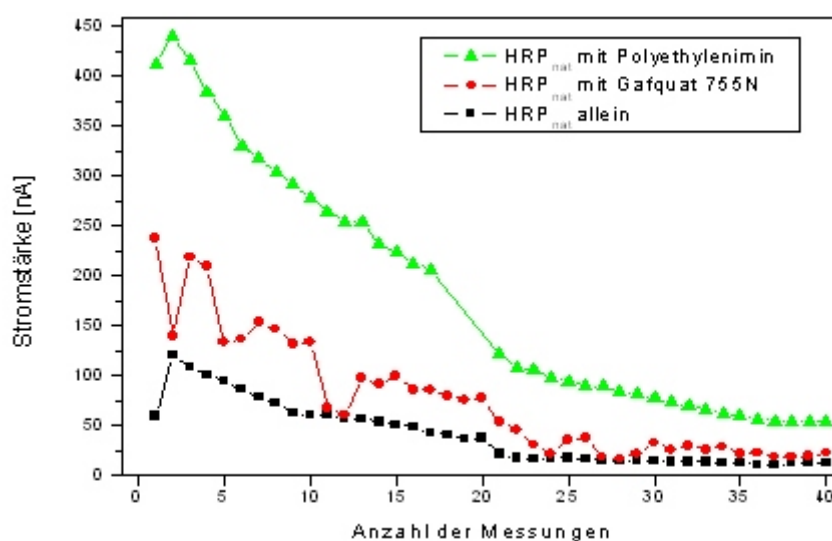


Abb. 4.22: Arbeitsstabilität von HRP-Elektroden mit den Additiven Gafquat 755N bzw. Polyethylenimin im FIA-System [-350 mV vs. Platin-Dickschicht-Referenz-Elektrode; H_2O_2 - bzw. Hydrochinon-Konzentration je 2,5 mM in der Detektorzelle]

Die fortlaufenden Messungen im FIA-System (wie in Abschnitt 4.1.4.3) zeigten für beide Additive eine im Vergleich zur HRP-Elektrode ohne Additive erhöhte Ausgangsaktivität (Abb. 4.22). In der Folgezeit nahmen die Signale für alle drei Elektroden, bezogen auf die jeweilige Ausgangsaktivität, kontinuierlich im gleichen Verhältnis ab. Einer anfänglichen Aktivierung der Enzymaktivität stand also keine beobachtete Stabilisierung im Einsatz gegenüber. Immerhin

zeigten die Resultate wie auch bei dem Enzym in Lösung mit den entsprechenden Additiven eine Steigerung der Ausgangsaktivität, die bei den Elektroden allerdings erheblich höher ausfiel.

4.1.4.5 Nachweis der Blindwerte an unbeschichteten und beschichteten Elektroden

Zur Abschätzung des Stromflußanteils, der unabhängig von Beladung der Paste mit Enzym resultiert, wurden an einer unbeschichteten, einer unbeschichteten, UV-belichteten sowie einer nur mit Paste bzw. einer mit HRP-enthaltenden Pastenmembran beschichteten Graphit-Dickschicht-Elektrode Messungen in dem FIA-System ($D = 6$) vorgenommen. Die jeweils erhaltenen Stromstärken bei Injektion von Wasserstoffperoxid oder Hydrochinon in Lösung (beides je 2,5 mM an der Stelle der Elektrode) sowie bei Coinjektion beider sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Wie im vorhergehenden Abschnitt diente als Lösungsmittel KPi-Puffer, die Elektroden wurden mit -350 mV vs. Platin-Dickschicht polarisiert. Die Konzentrationen der beiden Stoffe lagen hinsichtlich der enzymatischen Aktivität der HRP-Elektrode im Sättigungsbereich.

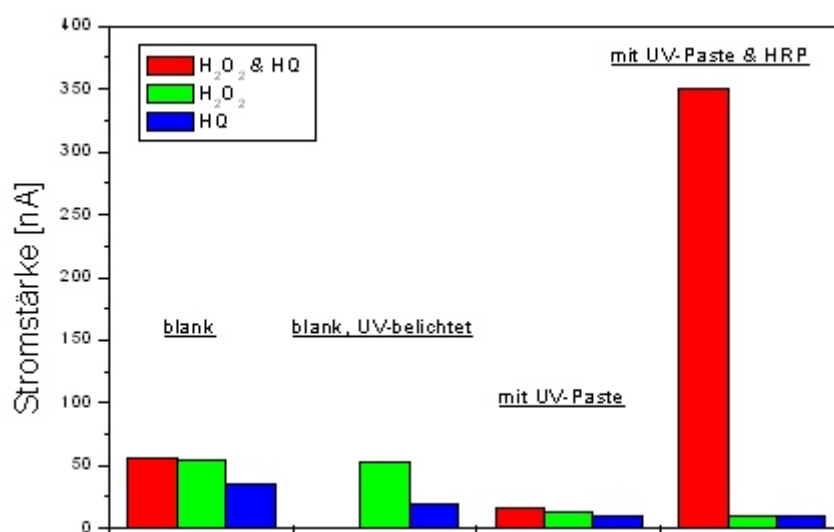


Abb. 4.23: Signalstärken für Substrat und Mediator bei blanken und beschichteten Elektroden 421-SS - Dickschicht-Elektroden (-350 mV vs. Pt-Dickschicht), [HQ: 2,5 mM, H_2O_2 : 2,5 mM; beides angegeben als Konzentrationen in der Detektorzelle], [0,2 μ g HRP / mg UV-Paste bei enzymbeschichteter Elektrode]

Beide Stoffe verursachten sowohl allein wie auch im Falle der Coinjektion ein Signal an den jeweiligen Elektroden. Es ist ersichtlich, daß durch die Beschichtung mit UV-Paste die

resultierenden Ströme im Vergleich zur unbeschichteten Elektrode um den Faktor 3-4 geringer waren, was durch die Pastenmatrix als Diffusionsbarriere und verminderte Zugänglichkeit der Elektrodenoberfläche begründet ist. Die UV-Belichtung an sich hatte keinen Einfluß auf den Umsatz von Wasserstoffperoxid, das Signal von Hydrochinon verringerte sich jedoch um die Hälfte; coinjiziert wurde bei der belichteten Elektrode allerdings nicht. Gemessen an dem hohen enzymespezifischen Signal bei Coinjektion beider Stoffe von 350 nA durch das im enzymatischen Zyklus entstandene para-Benzochinon war das entsprechende Signal bei der beschichteten Elektrode ohne Enzym mit 15 nA um ein Vielfaches geringer, eine Verwendung zur H_2O_2 -Analytik ist also bei einer derartigen Elektrode grundsätzlich möglich. Der Enzymgehalt dieser Elektrode entsprach mit $0,2 \mu\text{g} / \text{mg}$ UV-Paste einer der im Abschnitt 4.1.4.6 getesteten, die dort erzielte Stromstärke von 360 nA bei den hier verwendeten Konzentrationen von Substrat und Mediator belegt eine gute Reproduzierbarkeit bei der Elektrodenherstellung (Abb. 4.20). Der Vergleich der erzielten Stromstärken der beschichteten Elektroden mit und ohne HRP zeigt für den Fall der alleinigen Injektion des Substrats H_2O_2 kein erhöhtes Signal der Enzymelektrode, direkter Elektronentransfer zur Rereduktion der Proteine war also nicht meßbar.

4.1.4.6 Wirkung von Polylysin als Pastenbeimischung in HRP-Elektroden

Die Untersuchung einer HRP-Elektrode (analog Abschnitt 4.1.4.5) mit Polylysin als Additiv ergab mit 37 nA bei Injektion von ausschließlich Wasserstoffperoxid ein relativ hohes Signal, mit zusätzlichem Mediator resultierten 150 nA (die Enzymbeladung entsprach derjenigen Elektrode mit geringerem HRP-Gehalt analog Abschnitt 4.1.4.3). Weil das relativ hohe Signal für Wasserstoffperoxid auf direkten Elektronentransfer hindeuten konnte, wurde deshalb diese Elektrode erneut untersucht. Wasserstoffperoxid wurde in zwei (Sättigungs-) Konzentrationen (2,5 mM bzw. 1,25 mM an der Stelle der Elektrode) injiziert. Nunmehr war die resultierende Stromstärke mit 12,5 nA für 2,5 mM erheblich geringer als in der ersten Meßreihe, die halbierte Wasserstoffperoxid-Konzentration erbrachte ein Signal von 7,5 nA (Abb. 4.24). Da auch die geringere H_2O_2 -Konzentration im Sättigungsbereich der HRP angesiedelt und das Signal recht genau halbiert ist, muß man davon ausgehen, daß die gemessenen Stromstärken ihre Ursache ausschließlich im reinen H_2O_2 -Umsatz an der Graphitoberfläche haben, direkter Elektronentransfer zu den Proteinen folgerichtig nicht gemessen wurde. Dafür spricht auch, daß bei kombinierter Injektion von Hydrochinon (2,5 mM in der Detektorzelle) sowie Wasserstoffperoxid in den beiden Konzentrationen (1,25 mM bzw. 2,5 mM in der Detektorzelle) die die Enzymaktivität wiedergebende Signalthöhen bei höherer H_2O_2 -Konzentration nur um etwa 20 % erhöht waren. Die abnehmende Signalthöhe bei Injektion der Wasserstoffperoxid-

Lösung im Vergleich zur ursprünglichen Meßreihe könnte ihre Ursache in einer durch H_2O_2 begründeten, weiteren Polymerisation in der Membran haben, die die Permeabilität weiter reduzierte. Auch ein schneller Aktivitätsverlust der HRP in diesen Membranen ist möglich, fiel doch das Signal bei Coinjektion von H_2O_2 und Hydrochinon bei der zweiten Messung mit etwa 100 nA im Vergleich zur ersten mit 150 nA um etwa ein Drittel geringer aus.

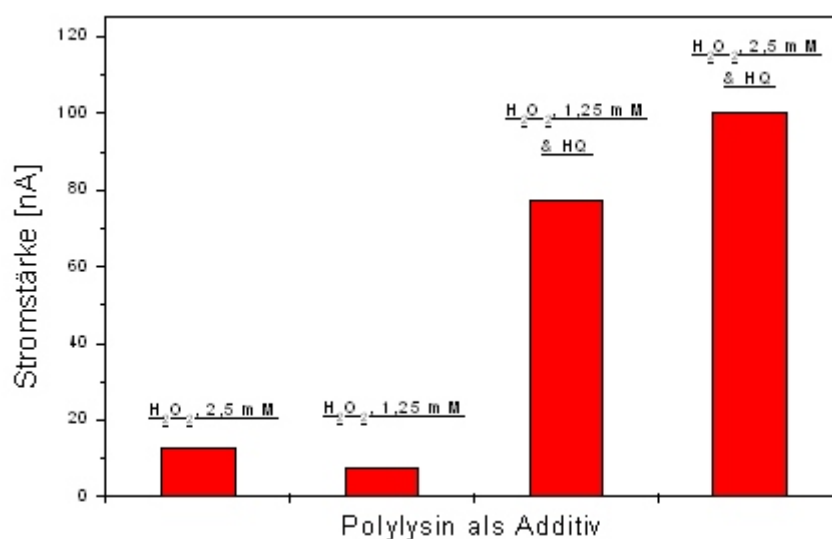


Abb. 4.24: Signalthöhen der Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit Polylysine als Additiv [-350 mV vs. Ag/AgCl]

Das einfache Bedrucken von Graphit-Dickschicht-Elektroden mit in UV-Paste eingemischter HRP erbrachte also auch bei Verwendung von Polylysine in dieser Konzentration keinen Hinweis auf direkten Elektronentransfer von Graphitoberfläche zum Protein in meßbarer Größenordnung.

4.1.4.7 Nachweis von direktem Elektronentransfer an Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektroden mit immobilisierter HRP durch zyklische Voltametrie

Nach den Untersuchungen von HRP-Elektroden, bei denen das Enzym gelöst oder adsorbiert an Graphitpartikel in die UV-Paste eingemischt worden war, wurde nun native HRP direkt auf eine Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode aufgebracht. Dazu wurden 4 μL einer konzentrierten wäßrigen HRP-Lösung [1,0 mg HRP / ml] auf die Arbeitselektrodenfläche pipettiert und nach dem Eintrocknen dünn mit UV-Paste überschichtet, die mit einem Rakel geglättet und anschließend belichtet wurde. Der Vergleich der zyklischen Voltamogramme dieser Elektrode mit einer solchen, bei der die Paste ohne HRP-Schicht aufgetragen worden war, zeigte bei

Messungen in reiner Pufferlösung nur Unterschiede im Bereich relativ hoher positiver bzw. negativer Polarisierung (Abb. 4.25). Im für den direkten Elektronentransfer von Elektrodenoberfläche zum Enzym maßgeblichen Bereich von etwa +600 mV bis ca. -400 mV vs. Ag/AgCl-Referenz war jedoch kein signifikanter Unterschied festzustellen.

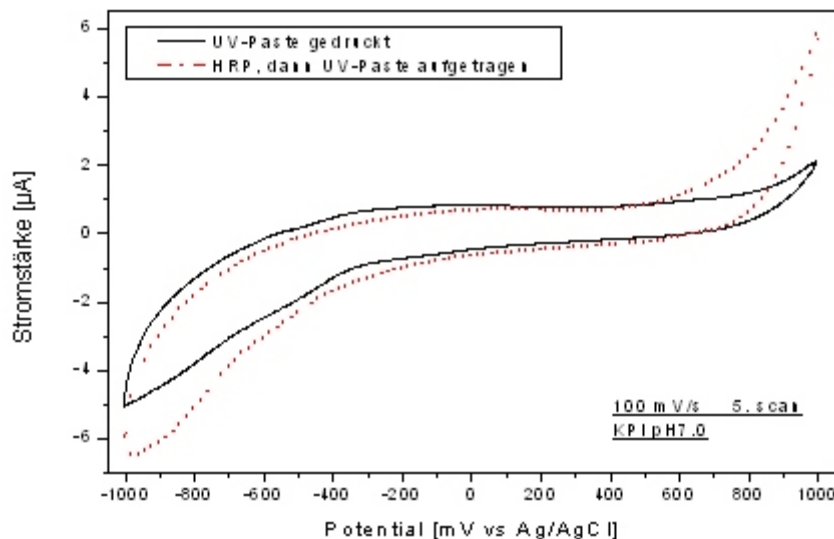


Abb. 4.25: Zyklische Voltammogramme mit enzymfreier sowie HRP-beschichteter Dickschicht-Elektrode in Pufferlösung

Nach der Zugabe des Substrats Wasserstoffperoxid in Sättigungskonzentration stieg der kathodische Stromfluß bei Polarisierung negativer als -300 mV im Bereich der H_2O_2 -Reduktion bei beiden Elektroden stark an (Abb. 4.26). Im für den direkten Elektronentransfer relevanten Potentialbereich blieb der Stromfluß für die enzymfreie Elektrode bis ca. -300 mV erhalten, wogegen die mit HRP beschichtete Elektrode einen signifikant höheren Stromfluß aufwies (vergrößert dargestellt in Abb. 4.27).

Der kathodische Stromfluß stieg, verglichen mit der Messung im reinen Puffer, ab +300 mV deutlich an und vergrößerte sich weiterhin bis zum Beginn der H_2O_2 -Umsetzung an der Graphitoberfläche ab -300 mV. Diese Messungen belegen direkten Elektronentransfer von der Elektroden-Oberfläche zur HRP, die durch die Reaktion mit dem Substrat Wasserstoffperoxid in oxidierte Form vorlag und durch Elektronen von der polarisierten Graphitoberfläche während des zyklischen Voltamogramms rereduziert wurde.

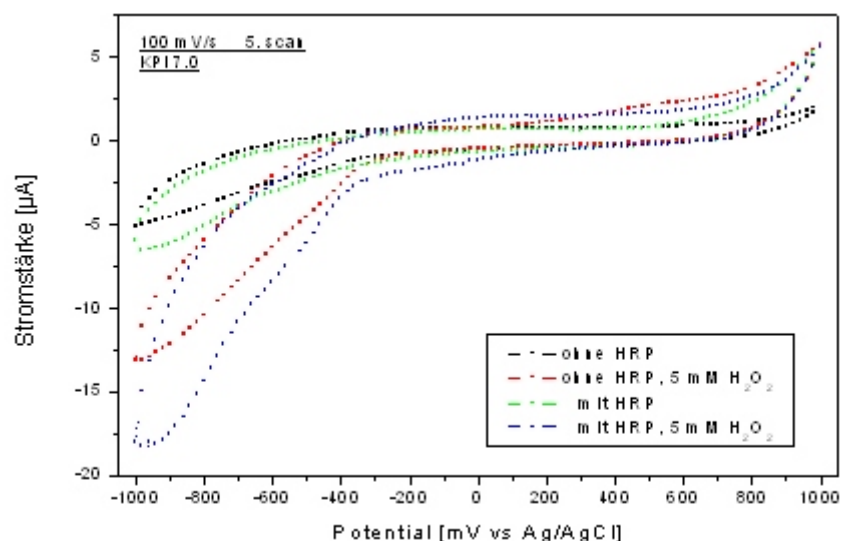


Abb. 4.26: Zyklische Voltamogramme mit enzymfreier sowie HRP-beschichteter Dickschicht-Elektrode mit und ohne Substrat

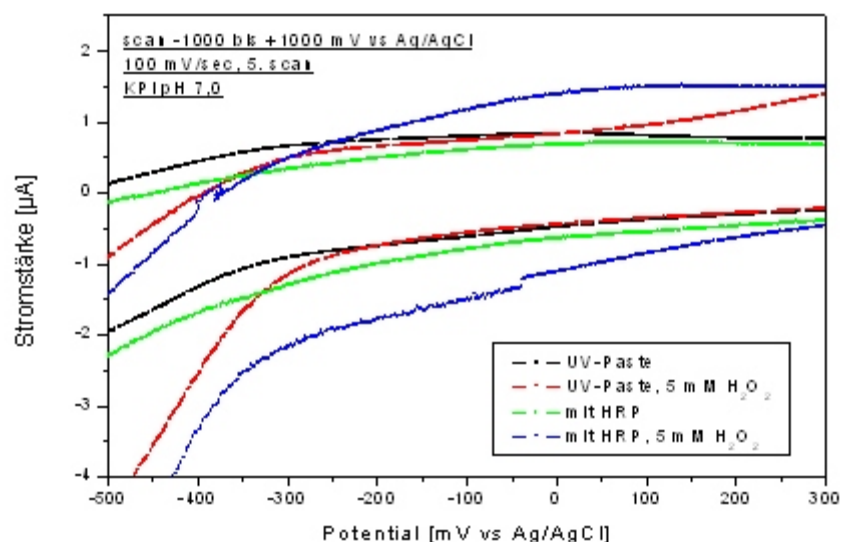


Abb. 4.27: Nachweis von direktem Elektronentransfer im zyklischen Voltammogramm (Ausschnittvergrößerung von Abb. 4.26)

Die geringen Unterschiede in den Randbereichen der zyklischen Voltamogramme sind vermutlich durch Diffusionseffekte erklärlich, die sich durch die unmittelbare Umgebung mit und ohne Proteinbeschichtung nahe der Elektroden-Oberfläche ergaben. Kleinste Sprünge, die gelegentlich bei den Messungen in den Strom-Spannungskurven wie in Abbildung 4.27

auftreten, waren offensichtlich gerätebedingt und bedeuteten keine Einschränkung ihrer Interpretation.

4.1.4.8 Test auf Diffusionslimitierung von H_2O_2 in der UV-Pastenmembran

Mit einer ausschließlich mit UV-Paste beschichteten Elektrode 421-SS - Elektrode wurde ein Test auf Diffusionslimitierung hinsichtlich der Reduktion von Wasserstoffperoxid durchgeführt. Zyklische Voltamogramme mit verschiedenen konzentrierten H_2O_2 -Lösungen bis 20 mM zeigten im Bereich der Reduktion um -900 mV vs. Ag/AgCl einen fast linearen Anstieg des kathodischen Stromes, ebenso im Plateaubereich der Oxidation um +600 mV (Abb. 4.28).

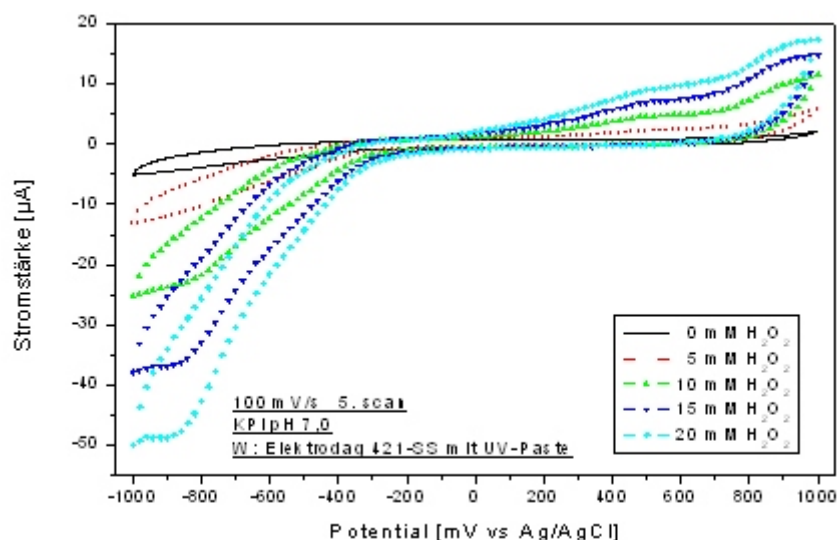


Abb. 4.28: Abhängigkeit des Wasserstoffperoxid-Umsatzes an einer beschichteten Elektrode 421-SS - Elektrode von der Konzentration

Bei konstanter Geschwindigkeit der Potentialänderung (Scan-Rate) ändert sich die Dicke der Diffusionsgrenzschicht, aus der die abreagierenden Moleküle zur Elektrodenoberfläche gelangen, nicht, sofern sich ein stationärer Zustand eingestellt hat [57]. Dies war bei den hier gezeigten Voltamogrammen der Fall, sie repräsentierten jeweils den 5. Scan. Da die Stromstärke, und damit der Umsatz des Wasserstoffperoxids an der Elektrodenoberfläche, bis zu der relativ hohen Konzentration von 20 mM praktisch linear zunahm, war die Permeabilität des kleinen Moleküls H_2O_2 in der UV-Pastenmatrix hoch genug, um die ständige Nachlieferung zur Graphitoberfläche zu gewährleisten. Allerdings zeigt die Form der zyklischen Voltamogramme bei -900 mV ein allmähliches Übergehen in die Stufenform, was für eine einsetzende

Abhängigkeit des H_2O_2 -Umsatzes von der Diffusion ab etwa 15 mM H_2O_2 spricht. Eine nachweisbare Verarmung der Diffusionsgrenzschicht an Wasserstoffperoxid trat also erst bei den höheren getesteten Konzentrationen sowie bei Potentialen niedriger als -800 mV bzw. höher als +400 mV vs. Ag/AgCl auf. Da die H_2O_2 -Konzentrationen bei den analytischen Messungen um Größenordnungen niedriger lagen und die Elektroden jeweils geringer polarisiert waren, konnte davon ausgegangen werden, daß die enzymatischen Reaktionen hinsichtlich der Substratkonzentration nicht diffusionslimitiert waren.

4.1.4.9 Nachweis von direktem Elektronentransfer an einer Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode mit nativer HRP durch Chronoamperometrie

Analytische Messungen mit enzymatischen Elektroden werden meistens durchgeführt, indem diese kontinuierlich mit einem definierten Potential polarisiert werden, das zum elektrochemischen Umsatz des gewünschten Analyten geeignet ist und dadurch einen meßbaren Stromfluß verursacht.

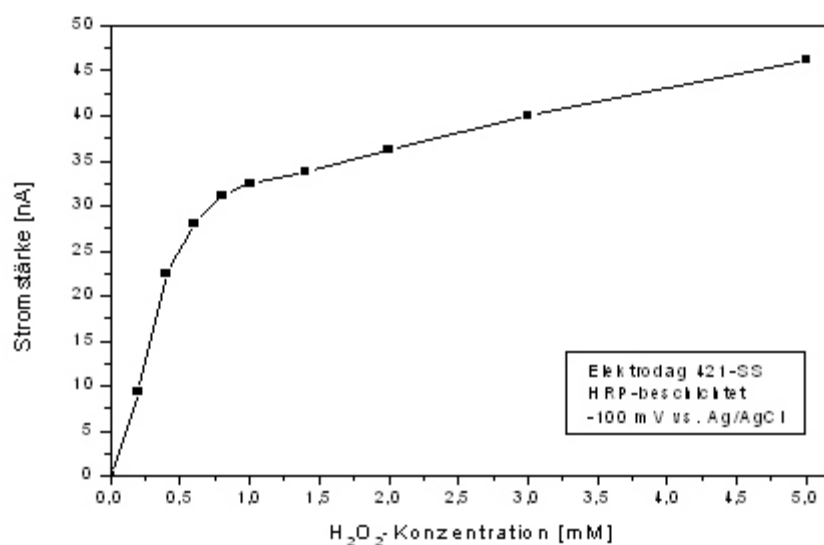


Abb. 4.29: Direkter Elektronentransfer mit einer HRP-beschichteten Dickschicht-Elektrode (Elektrode 421-SS)

Nach den Resultaten aus Abschnitt 4.1.4.7 sollte bei den hier verwendeten Dickschicht-Elektroden zur Erfassung von direktem Elektronentransfer zur durch die Substratreaktion oxidierten HRP ein Potential zwischen +200 mV und -250 mV vs. Ag/AgCl gewählt werden, da hier zum einen direkter Elektronentransfer zur nativen HRP nachgewiesen wurde und zum

anderen im Vergleich dazu kein signifikanter Stromfluß durch elektrochemische Umsetzung des Substrats H_2O_2 an der Elektrodenfläche auftrat. Gewählt wurde für weitere Experimente eine Polarisierung der Elektrode von -100 mV, da bei diesem Potential ausreichend hohe Stromstärken im zyklischen Voltammogramm detektiert werden konnten und der Beginn der H_2O_2 -Reduktion noch etwa 150 mV in Richtung negativen Potentials verschoben war.

Die chronoamperometrische Messung mit einer mit nativer HRP beschichteten Elektrode 421-SS - Dickschicht-Elektrode, die mit -100 mV vs. Ag/AgCl polarisiert wurde, erbrachte bei sukzessiver Zugabe des Substrats Wasserstoffperoxid eine klassische enzymatische Sättigungskurve (Abb. 4.29). Diese kann nur durch direkten Elektronentransfer von der Elektrodenoberfläche zum aktiven Zentrum der Peroxidase verursacht worden sein, denn Elektroden ohne entsprechende Enzymbeschichtung lieferten bei H_2O_2 -Zusatz erheblich niedrigere Ströme mit ausschließlich linearem Anstieg. Der Übergang vom linearen zum Substratsättigungsbereich lag zwischen 0,5 und 1,0 mM H_2O_2 . Der analytisch nutzbare Bereich bei dieser Elektrode bis maximal 0,5 mM Wasserstoffperoxid lieferte eine Sensitivität von ca. 50 nA / mM.

4.1.4.10 Einfluß des pH-Wertes auf den direkten Elektronentransfer

In der Regel ist man an bei Messungen an einem möglichst hohen Signal interessiert, um eine hohe Empfindlichkeit des Sensors sowie eine niedrige untere Meßgrenze in bezug auf den Analyten zu erreichen [109].

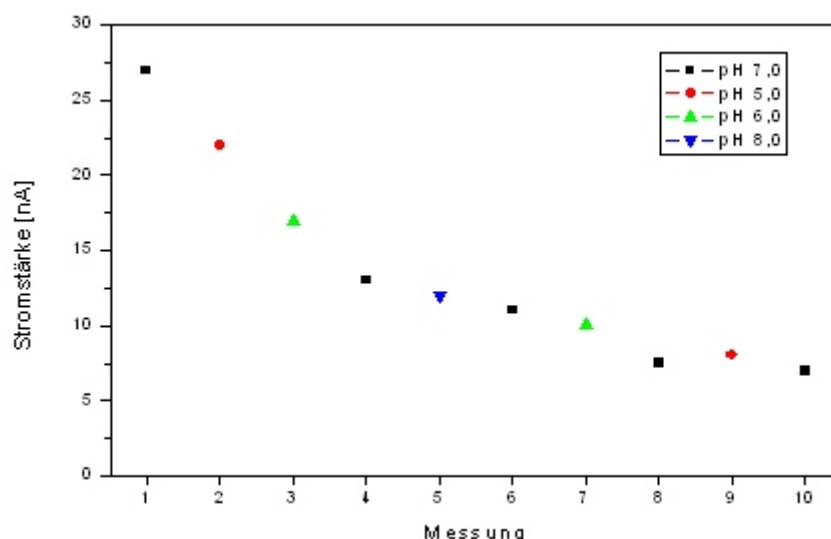


Abb. 4.30: Direkter Elektronentransfer bei verschiedenen pH-Werten (KPi-Puffer; H_2O_2 -Konzentration: 100 μM)

Die enzymatische Aktivität hängt neben anderen Einflußgrößen auch vom pH-Wert des umgebenden Mediums ab [110]. Der direkte Elektronentransfer als ein Maß für die Aktivität der unmittelbar an der Elektrodenoberfläche befindlichen Enzyme sollte deshalb vom pH-Wert beeinflusst werden.

Zur Untersuchung wurde die Höhe der Stromstärke des direkten Elektronentransfers für verschiedene pH-Werte von 0,1 M KPi ermittelt, durchgeführt wurden die Messungen nacheinander mit einer mit nativer HRP beschichteten Elektrode 421-SS - Elektrode. Da die Aktivität des Sensors von Messung zu Messung in neuer Vorlage stetig sank, wurde zwischendurch immer wieder in KPi pH 7,0 gemessen, um durch Interpolation die ermittelten Aktivitäten auf diesen beziehen zu können (Abb. 4.30).

Merkliche Unterschiede zwischen den getesteten pH-Werten waren, bezogen auf pH 7,0, nicht festzustellen. Dies steht auch im Einklang mit Untersuchungen der HRP, bei denen kein merklicher Einfluß des pH-Wertes im Bereich von pH 6-8 auf das Redoxpotential dieses Enzyms festgestellt worden war [111].

4.1.5 Untersuchungen mit Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden

4.1.5.1 Direkter Elektronentransfer mit nativer und rekombinanter HRP

Elektroden, die mit nativer bzw. rekombinanter HRP beschichtet waren, lieferten Stromstärken für den direkten Elektronentransfer in gleicher Größenordnung (Abb. 4.31).

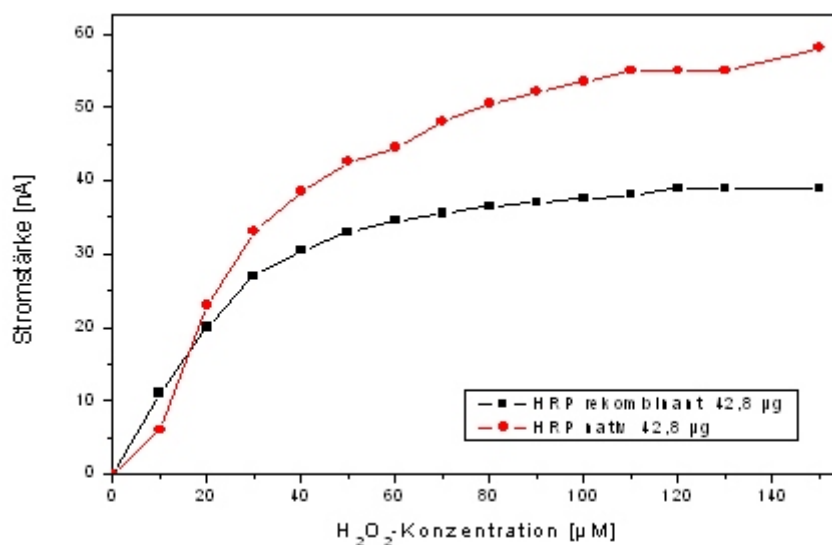


Abb. 4.31: Vergleich der Messungen des direkten Elektronentransfers von mit nativer bzw. rekombinanter HRP beschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden

Dies steht im Einklang mit den Messungen mit gelöstem Enzym, die in etwa gleich hohe spezifische Aktivitäten für native und rekombinante HRP ergeben hatten (HRP_{rec} ca. 70 % der HRP_{nat} ; siehe Abschnitt 4.1.2.1). Die Betrachtung dieses Befundes unter Berücksichtigung der Modellierung des Elektronentransfers ist in Abschnitt 4.1.9 enthalten.

4.1.5.2 Nachweis enzymatischer Aktivität immobilisierter nativer und rekombinanter HRP mit dem Mediator Hydrochinon

Die Abhängigkeit des Stromflusses von der Mediatorkonzentration wurde mit den oben verwendeten HRP-Elektroden (Abschnitt 4.1.5.1) ermittelt. Im chronoamperometrischen Experiment wurde die Elektrode mit -100 mV vs. Ag/AgCl polarisiert. Nach Zugabe des Substrats Wasserstoffperoxid in der ermittelten Sättigungskonzentration ($[150 \mu\text{M}]$; Messung 1 in Abb. 4.32) wurde der Mediator Hydrochinon hinzupipettiert ($[2 \text{ mM}]$, Messung 2 in Abb. 4.32). Der Reduktionsstrom erhöhte sich für beide Elektroden auf 150 nA.

Bei sukzessiver Addition des Substrates H_2O_2 (Zugabe je $[1 \text{ mM}]$, Messung 3-7 in Abb. 4.32) stieg die Stromstärke zunächst linear an und erreichte dann mit 3500 nA (nativ) bzw. 3200 nA (rekombinant) den Sättigungsbereich der enzymatischen Reaktion mit dem Mediator Hydrochinon. Eine weitere Addition von Hydrochinon erbrachte keine Steigerung des Signals, hinsichtlich beider Komponenten war die enzymatische Reaktion geschwindigkeitslimitierend.

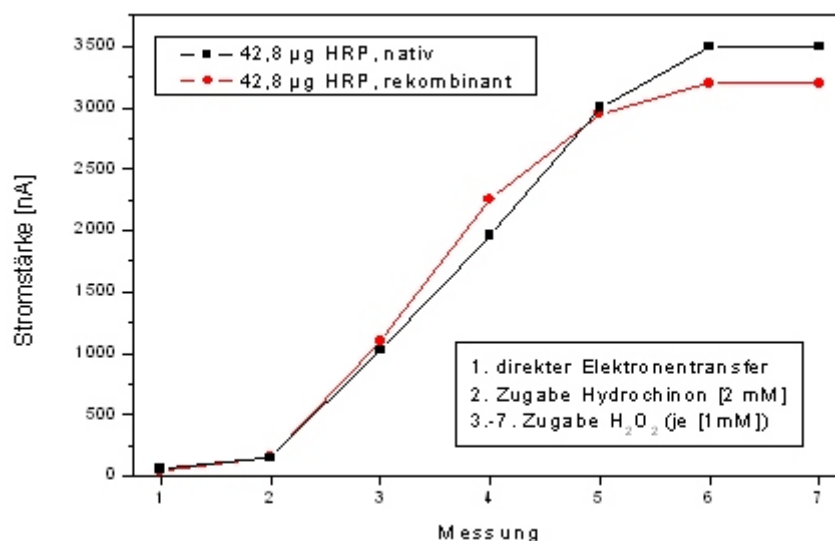


Abb. 4.32: Mediatorstrom mit HRP-beschichteten Dickschicht-Elektroden (Elektrode 423-SS)

Die im Vergleich zum direkten Elektronentransfer erheblich höheren Ströme erklären sich durch die Messung enzymatischer Aktivität nicht nur der unmittelbar an der Elektrodenoberfläche lokalisierten Enzyme, sondern auch der in den weiteren Schichten. Außerdem ist die Regeneration der HRP mit dem Mediator erheblich schneller, was durch den vergrößerten linearen Bereich bezogen auf das Substrat angezeigt wird. Die Sättigung ist bei Anwesenheit des Mediators erst bei etwa 4 mM H_2O_2 erreicht, also etwa um den Faktor 50 höher als beim direkten Elektronentransfer. Die linearen Bereiche der nativen und rekombinanten HRP auf den Elektroden deckten sich sowohl beim direkten Elektronentransfer als auch bei der Messung mit Mediator. Bei Verwendung eines negativeren Potentials wären die Stromstärken bei Mediatormessung noch steigerbar.

4.1.5.3 Gafquat 755N als Additiv zur immobilisierten nativen und rekombinanten HRP

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für die Stabilisierung von Proteinen durch den Zusatz bestimmter Additive. Die katalytische Aktivität von Peroxidase wurde durch bestimmte Kohlenhydrate ([50], in Lösung) oder auch Polyelektrolyte wie DEAE-Dextran ([112], immobilisiert) bzw. durch die kombinierte Beimischung solcher Stoffe stabilisiert. Eine allgemein gültige Erklärung für diese Schutzwirkung konnte bisher nicht gegeben werden, zumal bei bestimmten Proteinen unterschiedliche Additive - noch dazu in jeweils verschiedenen Konzentrationen bzw. Kombinationen - aktivitätserhaltend wirken [113, 114].

Zur Erhöhung der Stromausbeuten des direkten Elektronentransfers wurde hier der zur Beschichtung der Dickschicht-Sensoren eingesetzten HRP-Lösung der kationische Polyelektrolyt Gafquat 755N beigegeben. Gafquat 755N ist ein synthetisches Copolymer aus Vinylpyrrolidon und Dimethylaminoethyl-Methacrylat mit einem pK-Wert >14 , ist also in Lösung stets positiv geladen (Abb. 4.33). Verwendung findet es hauptsächlich als Detergens in Reinigungsmitteln. Ziel war, durch den Zusatz von Gafquat eine Stabilisierung des Enzyms beim Eintrocknen zu erreichen und die Stromausbeuten hinsichtlich des direkten Elektronentransfers zu steigern.

Für die getesteten Relationen von nativer und rekombinanter HRP zu Gafquat 755N ergab sich ein einheitliches Resultat. Im Vergleich zur Beschichtung des Sensors ohne den Zusatz des Additivs verdoppelten sich bei Sättigungskonzentration von Wasserstoffperoxid hinsichtlich des direkten Elektronentransfers die Stromstärken in etwa (Abb. 4.34). Dieser aktivitätssteigernde Effekt war auch für die native HRP in Lösung beobachtet worden (Abschnitt 4.1.2.3) sowie mit Mediatormessungen in Enzymmembranen (Abschnitt 4.1.4.4). Die erzielten Stromstärken für die native HRP waren unabhängig von den getesteten Enzym-Gafquat-Masse-Relationen (Abb. 4.35).

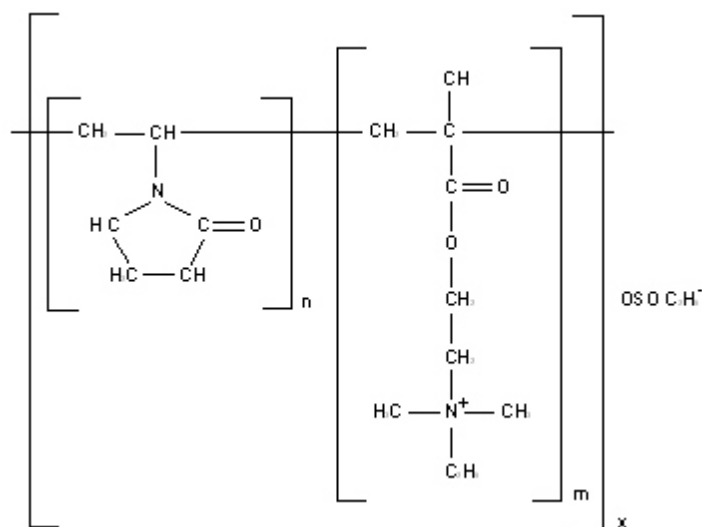


Abb. 4.33: Molekulare Struktur von Gafquat 755N ($m = 20$, $n = 80$)

Außerdem fällt auf, daß bei Verwendung von Gafquat 755N die erhaltenen Stromstärken für die rekombinante und native HRP fast deckungsgleich waren (Abb. 4.34), was gut mit den gemessenen spezifischen Aktivitäten ohne Additive in Lösung übereinstimmt (Abschnitt 4.1.2.1). Dies spricht weiterhin für eine protektive Wirkung bei der Immobilisierungsprozedur durch das Polymer, insbesondere bei der rekombinanten HRP, deren spezifische Aktivität in Lösung um etwa ein Drittel geringer war. Das Ansprechverhalten der Sensoren mit Gafquat 755N war erheblich verbessert, die mit der H_2O_2 -Konzentration korrespondierende Stromstärke stellte sich nach ungefähr 20 Sekunden ein statt nach etwa ein bis zwei Minuten bei Sensoren ohne Additiv.

Bei Einsatz des Additivs sollte man erwarten, daß sich dieses ebenfalls auf der Elektrodenoberfläche ablagert. Unter Berücksichtigung des Marcus-Theorems, welches eine exponentiell sinkende Elektronentransferrate mit zunehmender Distanz des aktiven Zentrums von der polarisierten Elektrodenoberfläche postuliert [24], wäre demnach eine Reduktion der Stromstärke oder sogar ein völliger Verlust des direkten Elektronentransfers die Folge, da die Entfernung der aktiven Zentren zumindest einiger Enzyme zur Elektrodenoberfläche vergrößert würde. Die Beobachtung aber, daß die Stromstärken für die native und rekombinante HRP nicht nur anstiegen, sondern sogar in etwa der Relation der spezifischen Aktivitäten in Lösung entsprachen, ließ einen ausschließlich protektiven Effekt unwahrscheinlich erscheinen. Auch war die Relation von HRP zu Gafquat im untersuchten Bereich nicht entscheidend für die erzielten Stromstärken.

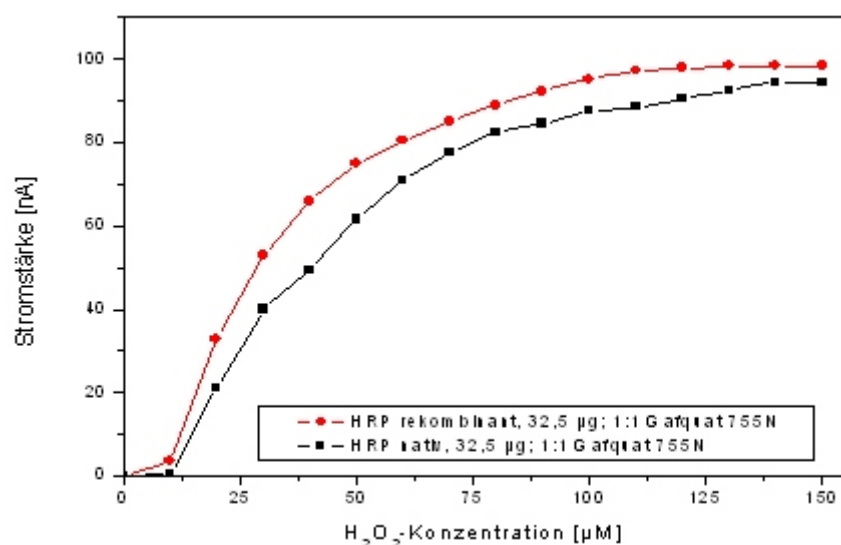


Abb. 4.34: Direkter Elektronentransfer von Elektrode 423-SS - Sensoren bei Beschichtung mit nativer bzw. rekombinanter HRP und Gafquat 755N als Additiv (-100 mV vs. Ag/AgCl)

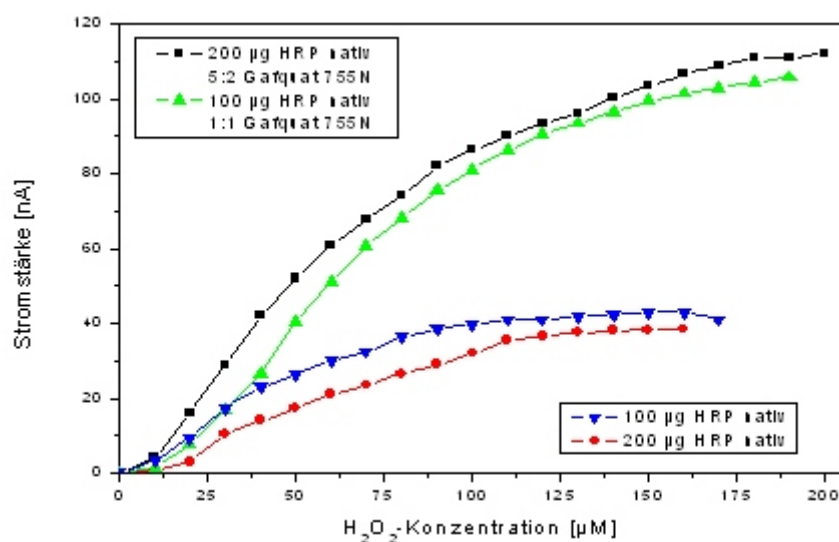


Abb. 4.35: Direkter Elektronentransfer bei Gafquat 755N als Additiv zu nativer HRP auf Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden

Vielmehr weisen die Resultate darauf hin, daß unabhängig vom Gehalt an Gafquat 755N eine immer gleiche Anzahl von Proteinmolekülen in unmittelbarer Nähe der Graphitoberfläche adsorbierte. Dies könnte in einer höheren Affinität der - praktisch nicht geladenen -

Proteinoberflächen zum hydrophoben Graphit begründet sein. Eine bestimmte Ausrichtung von nativer bzw. rekombinanter HRP unter dem Einfluß des Gafquats, was vergleichbar hohe Elektronentransferraten begünstigen könnte (siehe die Modellierung der Elektronentransferraten in Abschnitt 4.1.9), ist nicht ausgeschlossen.

4.1.5.4 Interpretation der Docking-Simulationen mit Additiven zur HRP

Ausgehend von der Vermutung, daß eine experimentell beobachtete Aktivierung oder Stabilisierung der (nativen) Peroxidase durch bestimmte Additive seine Ursache in einer jeweils charakteristischen Anlagerung hat, wurden Docking-Berechnungen mit Gafquat 755N, Polylysin, Polyethylenimin und DEAE-Dextran durchgeführt. Grundsätzlich war die Anlagerung von Gafquat 755N an die native HRP bereits im nativen Gel nachgewiesen worden [115].

Die Verteilung der Polymeruntereinheiten auf dem Protein zeigte keine echten Auffälligkeiten, was beispielhaft für Gafquat 755N illustriert ist (Abb. 4.36). Zwar dockten alle Moleküle an das native Protein einschließlich seiner Glykosilierungskortex, jedoch ergaben sich abgesehen von einer Häufung in der Nähe der Kohlenhydratreste keine bevorzugten Bereiche. Allerdings sind besonders Vertiefungen in der HRP-Oberfläche Ziel der Anlagerung, was möglicherweise den stabilisierenden Effekt von Gafquat 755N in Lösung bedingt, indem Wassermoleküle von diesen Bereichen der HRP-Oberfläche verdrängt werden. Durch unweigerlich auftretende Wechselwirkungen mit den geladenen Seitenketten des Polymers ist eine reduzierte Reaktivität der Aminosäurereste mit freien Radikalen oder auch Sauerstoff denkbar. Proteininternes Crosslinking würde durch diese Wechselwirkungen minimiert, da die Aminosäureseitenketten sterisch auf Abstand gehalten werden [9]. Eine Stabilisierung der Aktivität wäre die Folge. Weiterhin ist durch die Verdrängung der Wassermoleküle die Brownsche Molekularbewegung reduziert und die Proteinhülle dadurch geringerem mechanischen Stress ausgesetzt, was zu einem verringertem Verlust der Tertiärstruktur des Polypeptids in Lösung führen sollte [97].

Da die statistische Verteilung mehr oder weniger für alle berechneten Moleküle galt, sich jedoch in den Experimenten auch zeitabhängig unterschiedlich hohe Aktivitäten bei Verwendung der Additive zeigten, ist die Schlußfolgerung hinsichtlich der Beeinflussung der Enzymaktivität durch Anlagerung an bestimmte Domänen unter Betrachtung ausschließlich dieser Resultate nicht zulässig. Eine Kausalität zwischen beobachteter Aktivierung (und Stabilisierung) der HRP durch den Zusatz bestimmter (geladener) Polymere bzw. niedermolekularer Stoffe einerseits und Docking derselben an das Protein andererseits kann nach den Ergebnissen der Docking-Simulationen nicht postuliert werden. Hinsichtlich des bzw. der auftretenden Effekte in bezug auf die Enzymaktivitäten muß nach anderen Erklärungsmodellen als einer simplen Anlagerung von Additiven gesucht werden, denn die Diversität der gerechneten Verbindungen bei

gleichzeitiger, im Grunde statistischer Verteilung ihrer Anlagerung läßt eine spezifische Wechselwirkung etwa mit bestimmten Aminosäureresten am aktiven Zentrum unwahrscheinlich erscheinen.

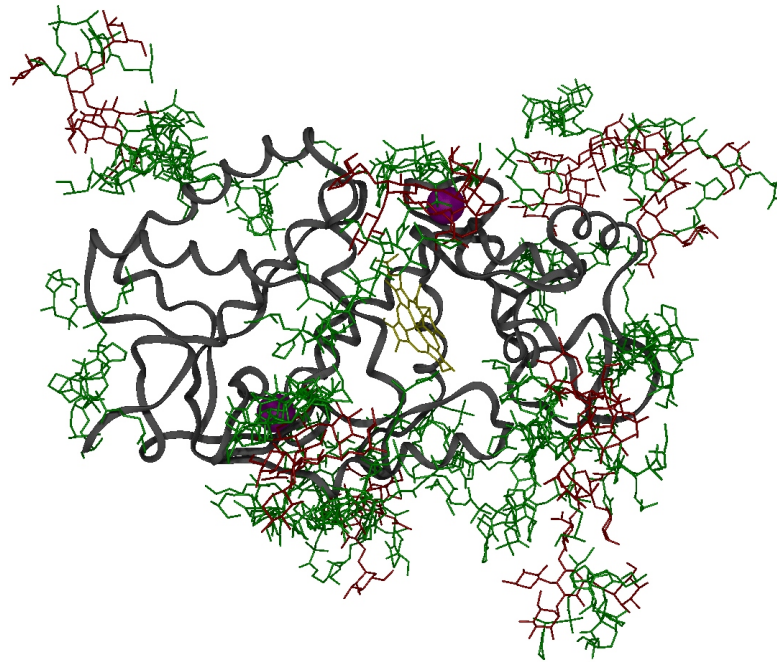


Abb. 4.36: Docking-Simulation von Gafquat 755N - Untereinheiten (grün) an die native HRP (Protein dargestellt als graues Band, aktives Zentrum oliv, Glykosilierung rot, Calcium-Ionen magenta)

4.1.5.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unbeschichteter Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer unbeschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode zeigt eine weitgehend homogene Struktur mit einzeln herausragenden Partikeln (Abb. 4.37). Diese Partikel sind sehr wahrscheinlich Graphitfragmente, die in der ausgehärteten Binderpaste eingebettet sind.

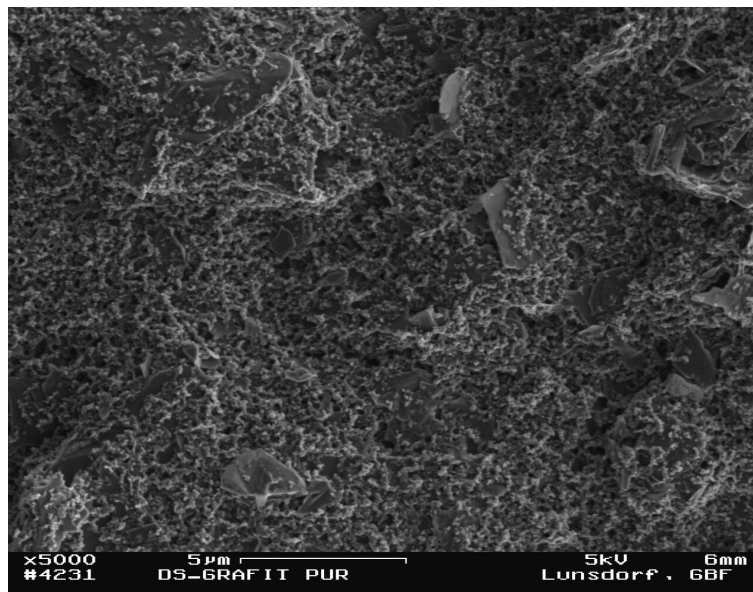


Abb. 4.37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer unbeschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode [Aufnahme von Dr. H. Lünsdorf, GBF]

4.1.5.6 Nachweis der unterschiedlichen Beschaffenheit der Enzymschicht mit und ohne Gafquat 755N als Additiv mittels Rasterelektronen-Mikroskopie (REM)

Mit nativer HRP beschichtete Elektroden mit und ohne Gafquat 755N als Additiv wurden phänomenologisch mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. Die Proteinschichten waren auf unterschiedlichen Bereichen einer Arbeitselektrodenfläche aufgebracht und nicht mit UV-Paste überdruckt worden. Die Betrachtung beider Proteinschichten zeigt eine vollständige Belegung der Oberfläche, auch die herausragenden Graphitpartikel sind bei Verwendung dieser Enzymmenge (entspricht $40 \mu\text{g HRP} / 7 \text{ mm}^2$) bedeckt (Abb. 4.38 und 4.39). Die Beschichtung mit rekombinanter statt nativer HRP ohne Additiv ließ keinen Unterschied im Aussehen der Proteinschicht erkennen.

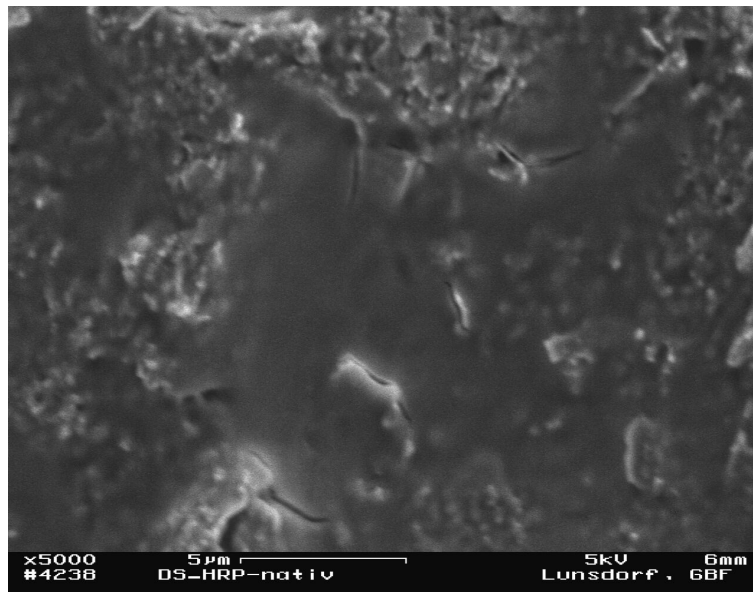


Abb. 4.38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit nativer HRP beschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode [Aufnahme von Dr. H. Lünsdorf, GBF]

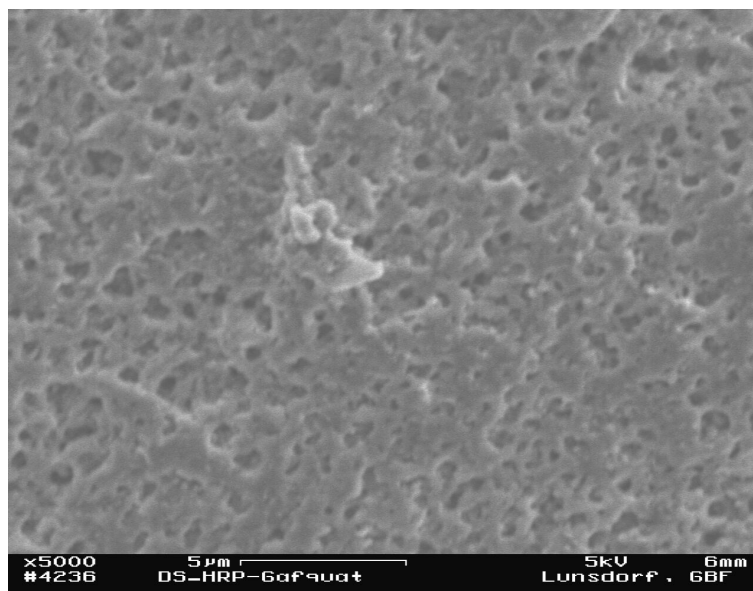


Abb. 4.39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer mit nativer HRP und dem Additiv Gafquat 755N (im Massenverhältnis 1:1) beschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode [Aufnahme von Dr. H. Lünsdorf, GBF]

Darüber hinaus zeigten diese Aufnahmen viele blasenartige Löcher in der Protein-Gafquat-Schicht, die bei der Beschichtung mit HRP alleine nicht auftraten. Offensichtlich hat die Beimischung von Gafquat 755N (hier im Massenverhältnis 1:1) einen Einfluß auf die resultierende Struktur der Schicht, möglicherweise während der Verdunstung des Lösungsmittels Wasser.

Die schnellere Ansprechzeit der Sensoren mit Gafquat 755N in der Enzymschicht in bezug auf direkten Elektronentransfer ist unter Umständen in den festgestellten Vertiefungen begründet. Diese sind bei den fertigen Sensoren mit wasserdurchlässiger UV-Paste ausgefüllt und sollten eine effektive Diffusion des Substrats Wasserstoffperoxid hin zu den unmittelbar an der Graphitoberfläche adsorbierten Enzymen ermöglichen. Da nur diejenigen HRP-Enzyme am direkten Elektronentransfer teilnehmen, die in engem Kontakt zur polarisierten Elektrodenoberfläche stehen, können diese im Falle der Beimischung des Additivs schneller nach Substratzugabe in den durch H_2O_2 verursachten Redoxzyklus eintreten.

4.1.5.7 Einfluß der Enzymbeladung auf den direkten Elektronentransfer

Die Menge an aufgebrachtem Enzym sollte bis zu einer bestimmten Beladung die Stromausbeute des direkten Elektronentransfers steigern. Da ausschließlich diejenigen Enzyme in unmittelbarem Kontakt zur Elektrodenoberfläche am direkten Elektronentransfer teilnehmen können, ist nach vollständiger Bedeckung der Elektrodenoberfläche bei Erhöhung der Proteinmenge keine weitere Steigerung des Stromflusses zu erwarten. Weitere Enzyme würden dann nur die Dicke der Proteinschicht steigern, am direkten Elektronentransfer könnten sie aufgrund der zu großen Distanz zur Elektrodenoberfläche nicht teilnehmen.

Zur Ermittlung der notwendigen HRP-Menge zur Erreichung einer gleichbleibend hohen Stromausbeute wurden mehrere unbehandelte Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden mit nativer sowie rekombinanter Peroxidase beschichtet. Die Abbildung 4.40 zeigt, daß bei Belegungen von 20-40 μg HRP / Elektrode (7 mm^2) das Signal noch mit der Enzymmenge anstieg (kinetische Kontrolle), bei höheren Beladungen jedoch keine weitere Signalsteigerung mehr beobachtet werden konnte (Diffusionskontrolle). Die Signale für die native und rekombinante HRP unterschieden sich nicht bzw. nur in geringem Umfang. Auch beim Zusatz von Gafquat wurde bei einer Belegung mit 40 μg das maximale Signal erreicht. Allerdings war dieser Wert etwa 2,5fach höher als der ohne Gafquat (100 nA gegenüber 40 nA).

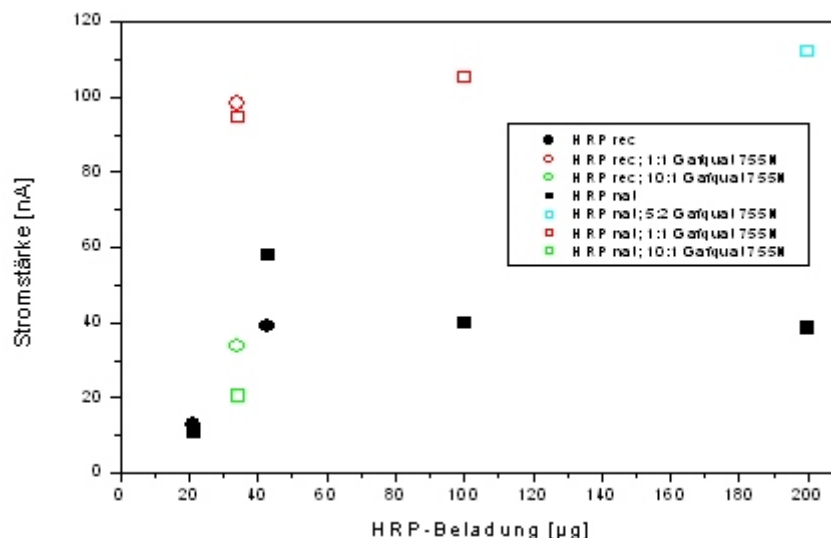


Abb. 4.40: Erzielte Stromstärken (für H_2O_2 -Sättigungskonzentration) bei unterschiedlicher HRP-Beladung der Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden (unbehandelt), zum Teil mit Gafquat 755N als Additiv (ein Meßwert repräsentiert einen Datenpunkt)

4.1.6 Untersuchungen mit polierten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektroden

4.1.6.1 Direkter Elektronentransfer mit nativem und rekombinanten HRP

Maschinelles Polieren der Dickschicht-Elektroden führte zu glatteren, glänzenden Oberflächen. Nach Aufbringen der Enzyme und anschließender Fixierung mit UV-polymerisierbarer Paste wurden die Sensoren analog den nicht polierten im Becherglasversuch auf direkten Elektronentransfer infolge von Substratzugabe getestet. Es resultierten vergleichsweise hohe Ströme sowohl bei Verwendung von nativem als auch rekombinanten Enzym (Abb. 4.41 und 4.42).

Eine positive Beeinflussung der elektrochemischen Aktivität von siebgedruckten Elektroden durch eine solche Vorbehandlung wurde auch bereits bei einer anderen Untersuchung beobachtet [62]. Sie wird im allgemeinen darauf zurückgeführt, daß die oberste Schicht einer solchen Elektrode produktionsbedingt einen erhöhten Anteil an nicht-leitfähigem Bindematerial aufweist, und diese passivierende Schicht durch das Polieren abgetragen wird. Zum anderen ist den REM-Aufnahmen (Abb. 4.37) zu entnehmen, daß die sichtbaren Graphitpartikel zum Großteil im umgebenden Binder eingebettet sind und nur zum Teil herausragen.

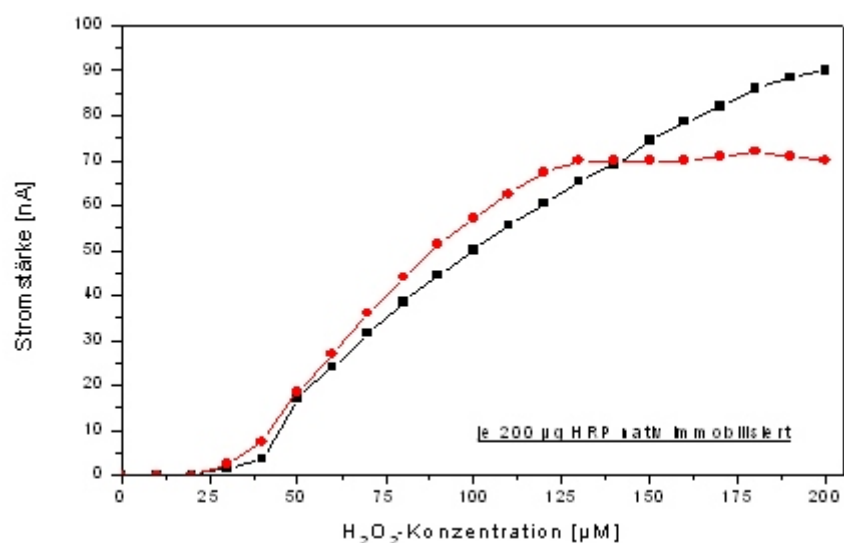


Abb. 4.41: Erzielte Stromstärken mit zwei polierten Elektroden 423-SS - Dickschicht-Elektroden, beide beschichtet mit nativer HRP

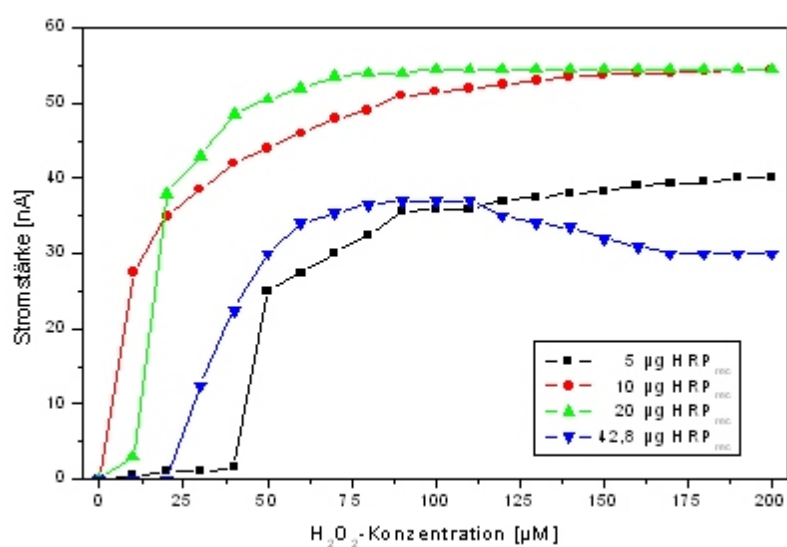


Abb. 4.42: Erzielte Stromstärken für direkten Elektronentransfer mit polierten Elektroden 423-SS - Dickschicht-Elektroden, beschichtet mit rekombinanter HRP (Polarisierung -100 mV vs. Ag/AgCl)

Das Polieren könnte die Partikel derart abgetragen haben, daß ein verhältnismäßig großer Querschnitt zugänglich und damit die eigentliche Graphitoberfläche vergrößert wurde. Möglicherweise wurden auch weitere Graphitpartikel freigelegt, die nach dem Druckvorgang

gänzlich in der noch nicht ausgehärteten Paste versunken waren. Insgesamt ergab sich eine Oberfläche mit erhöhter Leitfähigkeit, die trotz geringerer Gesamtfläche durch Abnahme der Rauigkeit einen verbesserten direkten Elektronentransfer ermöglichte. Aufgrund der verminderten Rauigkeit ist vermutlich auch mit 10 µg die maximale Beladung mit HRP_{rec} über die hinaus die Stromausbeute des direkten Elektronentransfers nicht mehr gesteigert werden kann, schon bei geringeren Belegungen als bei unbehandelten Elektroden erreicht (Abb. 4.42). Die wieder abfallende Stromstärke bei einer Beladung mit 42,8 µg Enzym sind in der geringen Reproduzierbarkeit der Sensorherstellung begründet.

4.1.6.2 Dextran-Sulfat und Polyethylenimin als Additive bei nativer und rekombinanter HRP

Die Beimischung von ausgewählten Additiven steigerte die erzielten Stromstärken hinsichtlich des direkten Elektronentransfers bei polierten Elektroden 423-SS - Elektroden weiter (Abb. 4.43). Generell wurden Effekte sowohl bei dem nativen als auch dem rekombinanten Enzym festgestellt. Eingesetzt wurde in verschiedenen Massenverhältnissen Polyethylenimin, dessen stabilisierende Wirkung für Sensoren mit immobilisierten Peroxidasen bereits gezeigt werden konnte [116]. Bei der zitierten Untersuchung hatte sich weiterhin ein verkürztes Tailing des peakförmigen Signals im Fließsystem bei gleichzeitiger Erhöhung des Meßwerts gezeigt, ein Hinweis auf veränderte Diffusionseigenschaften der Enzymschicht. Ebenso hatte Polyethylenimin als Additiv eine Verbesserung bei einem amperometrischen Sensor mit Glyceroldehydrogenase / Diaphorase als immobilisierten Enzymen bewirkt, wobei zusätzlich zur verbesserten Stabilität ein vermindertes Fouling der Elektrodenfläche festgestellt worden war [117]. Da bei ersten Messungen der Zusatz von Dextran bzw. dem positiv geladenen DEAE-Dextran keine Verbesserung der Sensoreigenschaften erbracht hatte, wurde weiterhin das negativ geladene Dextran-Sulfat eingesetzt.

Bei Messungen mit Dextran-Sulfat als Additiv zur nativen HRP konnten sehr gute Resultate in bezug auf Signalthöhe des direkten Elektronentransfers sowie Ansprechzeit der Sensoren erreicht werden. Das Mengenverhältnis von Enzym zu Dextran-Sulfat wurde für die native und rekombinante HRP variiert, um ein eventuelles Optimum in der Relation zu ermitteln. Beschichtet wurden die Elektroden 423-SS - Elektroden in allen Fällen mit demselben Flüssigkeitsvolumen, das Gesamtgewicht von Enzym und Additiv war bei unterschiedlichen Relationen gleich. Über einen weiten Bereich blieben die erzielten Stromflüsse für beide Enzyme auf relativ hohem Niveau, nur im Falle der rekombinanten HRP war der direkte Elektronentransfer beim niedrigsten untersuchten Dextran-Sulfat-Gehalt deutlich reduziert (Abb. 4.43). Die erzielten Stromstärken waren mit dem nativen Enzym erheblich höher, das Signal bei

H_2O_2 -Sättigung (200 μM) bewegte sich im Bereich von etwa 300-400 nA und war damit etwa doppelt so hoch wie bei dem rekombinanten Enzym. Ein eindeutiges Optimum ist für den Dextran-Sulfat-Anteil im untersuchten Bereich nicht zu erkennen, die Werte für die native HRP deuten aber darauf hin, daß ein Anteil von 20 % die höchsten Signale liefern kann. Die erzielten Signale waren für das rekombinante Enzym bei höherem Additiv-Gehalt gegenüber Messungen ohne Dextran-Sulfat leicht erhöht. Das Ansprechverhalten der Sensoren war im Vergleich zu beschichteten Sensoren ohne Additiv durchweg verbessert, das Signal erreichte zumeist in wenigen Sekunden einen konstanten Wert. Praktisch verzögerungsfrei stellte sich die Stromstärke beim Sensor mit nativer HRP und Dextran-Sulfat im gleichen Verhältnis (50 % Additiv-Anteil) ein.

Der Einsatz von Polyethylenimin als Additiv erbrachte ein genau umgekehrtes Resultat wie die Verwendung von Dextran-Sulfat. Bei einem Massenanteil an Polyethylenimin von einem Drittel ergab sich eine Stromstärke von ca. 350 nA beim rekombinanten, aber nur ca. 150 nA beim nativen Enzym, was die erzielten Stromstärken bei Verzicht auf Additive etwa um den Faktor 3 übertraf. Die Kombination von Dextran-Sulfat und Polyethylenimin in gleichen Anteilen zu einem Gesamtanteil von 50 % ergab für die native HRP eine Stromstärke von nur etwa 100 nA. Der eigentlich positive Effekt von Dextran-Sulfat ging also nicht nur vollkommen verloren, das Signal war sogar noch geringer als bei der Verwendung von ausschließlich Polyethylenimin.

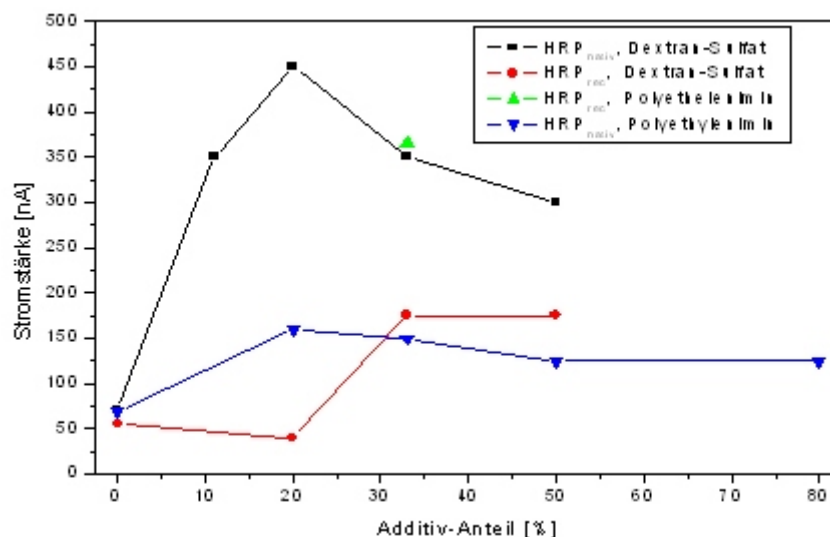


Abb. 4.43: Stromstärken des direkten Elektronentransfers bei unterschiedlichem Verhältnis von nativer und rekombinanter HRP zu Dextran-Sulfat und Polyethylenimin (bei Substratsättigung mit 200 $\mu M H_2O_2$)

Der lineare Bereich hinsichtlich der Wasserstoffperoxid-Konzentration wurde durch die Beigabe der Additive nicht verändert. Da beim direkten Elektronentransfer der Übertritt der Elektronen von der Elektrode zum Enzym und nicht die Reaktion mit dem Substrat die Reaktionsgeschwindigkeit limitierende Größe ist, zeigt dieser Befund, daß ein verbessertes Elektronenhopping über geladene funktionelle Gruppen der Additive nicht der Fall ist. Die erhöhte Stromausbeute spricht allerdings für eine Stabilisierung bzw. Aktivierung der Proteine während des Adsorbierens, eine kombinatorische Wirkung durch einen Synergieeffekt kann nicht ausgeschlossen werden. Die Stromausbeute würde so gesteigert, da die Menge an intaktem Enzym auf der Oberfläche vergrößert wird, der lineare Bereich hinsichtlich des Substrates bliebe wie beobachtet unverändert. Eine Auswirkung der Additive auf die Arbeitsstabilität wurde im Vergleich zu Sensoren ohne Additiv nicht festgestellt.

Aus der Literatur bekannte Untersuchungen der stabilisierenden Wirkung bestimmter Additive zeigten in der Regel nur Hinweise auf Eigenschaften, die ein geeigneter Zusatz aufweisen muß. Problematisch ist bei der Suche nach einem Erklärungsmodell insbesondere, daß ein bestimmter Stoff bei unterschiedlichen Proteinen verschiedene Effekte hervorrufen kann. Weiterhin ist das Verhältnis von Additiv zu Protein von Bedeutung, ebenso die Kombination verschiedener Zusätze [7]. Generell scheint das Vorhandensein geladener Gruppen in Polyelektrolyten im Zusammenspiel mit pH-abhängigen Teilladungen der Proteinhülle stabilisierend zu wirken, was am Beispiel des bienzymatischen Systems Alkohol-Oxidase / Peroxidase demonstriert worden war [8]. Dort waren die besten Resultate mit einer kombinierten Addition des positiv geladenen Polyethylenimins und der negativ geladenen Polyester-Sulfonsäure erzielt worden, bei der vorliegenden Arbeit erwies sich allerdings der Einsatz von negativ geladenem Dextran-Sulfat zusammen mit dem positiv geladenem Polyethylenimin bei der nativen HRP ungünstig. Auffällig ist hier insbesondere, daß die gegensätzlich geladenen Additive Dextran-Sulfat sowie Polyethylenimin konträre Resultate bei der rekombinanten sowie nativen HRP erbrachten. Dies muß seine Ursache in der Glykosylierung haben, obgleich dies nicht einsichtig ist, da die HRP bei dem hier verwendeten pH-Wert ohnehin nur sehr wenige Aminosäurereste in der Proteinhülle besitzt, die freie Ladungen aufweisen. So ist genau aus diesem Grund beim hier eingesetzten Isoenzym C der pI-Wert schwierig zu ermitteln, er liegt um pH 8,8 -9 [97, 118]. Möglicherweise induzieren Polyelektrolyte durch ihre Teilladungen einen bestimmten pH-shift in ihrer Mikroumgebung. Lagern sie sich bevorzugt an der Proteinhülle an, kann der pH-Wert hier lokal vom umgebenden Medium abweichen. Eine Induktion von Partialladungen an bestimmten Aminosäureresten ist daher vorstellbar, eventuell ergibt sich deshalb eine stabilisierende bzw. aktivierende Wechselwirkung, die für bestimmte Substrate auch unterschiedlich ausfallen kann. Die Rolle der Glykosylierung bei den hier vorliegenden Resultaten ist dennoch unklar, die Partialladungen der Additive an sich sind nach den

vorliegenden Ergebnissen sicher nicht allein ausschlaggebend für eine Verbesserung der Mikroumgebung der Enzyme.

4.1.7 Untersuchung der Elektrodenmaterialien Glassy-Carbon und Graphit

Zum Vergleich wurden neben den Elektrodag-Dickschicht-Elektroden (Elektrodag 423-SS bzw. 421-SS) mit Glassy-Carbon und Graphit auch andere Kohlenstoffmaterialien auf ihre Eignung für direkten Elektronentransfer mit der Peroxidase untersucht (siehe 3.4.4). Beide Elektrodenmaterialien bieten im Unterschied zu den Dickschicht-Elektroden, deren ausgehärtete Pasten eine Oberfläche aus Binder mit Graphitpartikeln zeigen, eine homogene Struktur, die dadurch eventuell eine erhöhte Leitfähigkeit und damit auch verbesserten Elektronentransfer zu adsorbierten Proteinen ermöglicht. Sowohl mit Glassy-Carbon [119, 120] als auch mit dem hier verwendeten Graphit [119, 121, 122, 123] war in der Vergangenheit direkter Elektronentransfer mit adsorbierter HRP nachgewiesen worden.

Mit den HRP-beschichteten Graphit-Elektroden konnte im Rahmen dieser Arbeit ein direkter Elektronentransfer mit der nativen Peroxidase nicht dargestellt werden. Der stets auftretende hohe Grundstrom verhinderte vermutlich die Identifikation der entsprechenden Signale sowohl bei zykovoltametrischen wie auch bei chronoamperometrischen Messungen (nicht gezeigt). Nur der indirekte Nachweis von Enzymaktivität bei Einsatz des Mediators gelang, die resultierenden Stromstärken waren in vergleichbarer Höhe wie bei den Elektrodag-Elektroden. Ebenso zeigten sich bei den linearen Bereichen von Wasserstoffperoxid und Hydrochinon keine Abweichungen. Dagegen erbrachten mit der nativen HRP beschichtete Glassy-Carbon-Elektroden Stromstärken durch direkten Elektronentransfer in einer Größenordnung, wie sie auch mit polierten Dickschicht-Elektroden erzielt wurden (Abb. 4.44). Die gezeigten Meßkurven belegen eine unbefriedigende Reproduzierbarkeit beim Immobilisieren der Enzyme, denn der resultierende Stromfluß bei der Elektrode mit einer Belegung von $12,5 \mu\text{g}$ nativer HRP war deutlich höher als der, der bei allen anderen Messungen mit diesen Elektroden erzielt wurde.

Auch deuteten die Resultate von weiteren mit unterschiedlichen HRP-Mengen beschichteten Glassy-Carbon-Elektroden auf einen Grenzwert hin, ab dem die Signale des direkten Elektronentransfers nicht mehr steigerbar waren, da auch ab dieser Menge die Proteinschicht nur dicker wurde, ohne daß weitere Proteinmoleküle am direkten Elektronentransfer hätten teilnehmen können (Abb. 4.45; gezeigt sind die höchsten mit den jeweiligen HRP-Belegungen erzielten Stromstärken für den direkten Elektronentransfer). Diese Grenzbeladung lag bei ungefähr $0,4 \mu\text{g HRP} / \text{mm}^2$. Der lineare Bereich hinsichtlich des direkten Elektronentransfers in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration deckte sich in etwa mit dem der Elektrodag-Sensoren, ebenso waren die Konzentrationsbereiche bei Mediator-Messung identisch.

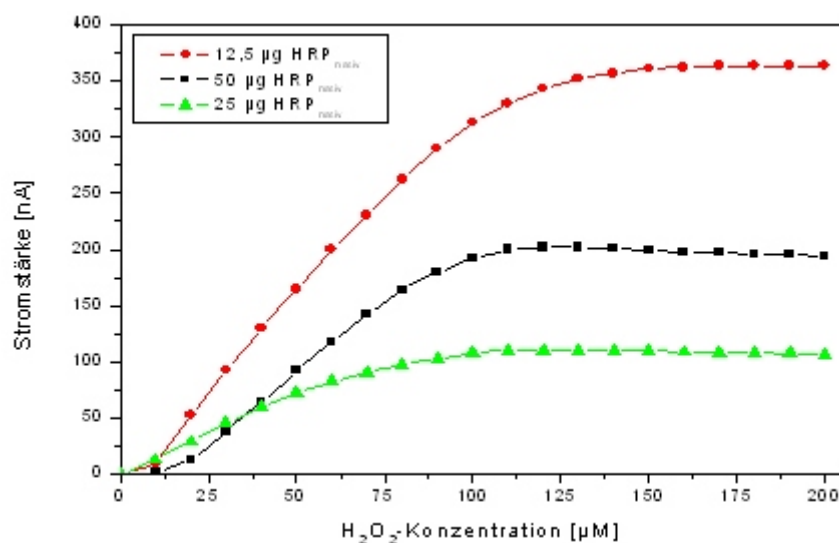


Abb. 4.44: Beispiele für die Messung von direktem Elektronentransfer für mit unterschiedlichen Mengen nativer HRP beschichteten Glassy-Carbon-Elektroden (Potential -100 mV vs. Ag/AgCl)

Mit über 350 nA wurde hier mit einem HRP-beschichteten Sensor die höchste Stromstärke infolge direkten Elektronentransfers in dieser Arbeit gemessen.

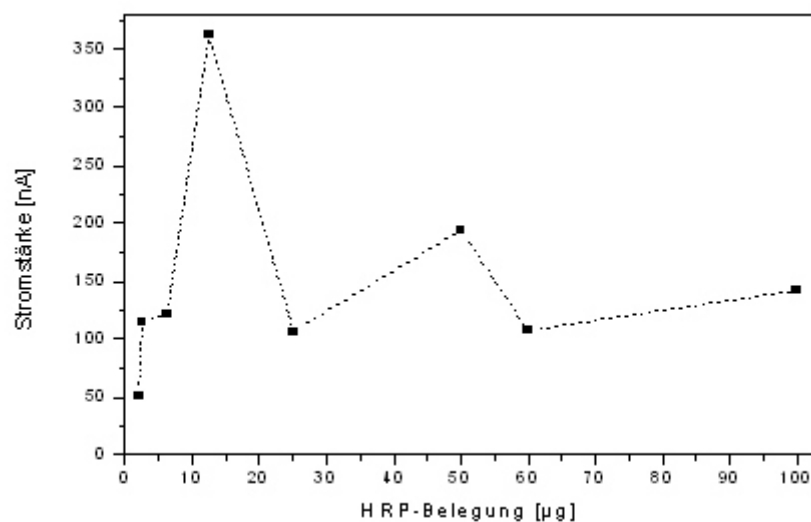


Abb. 4.45: Abhängigkeit der erzielten Stromstärke des direkten Elektronentransfers mit HRP-beschichteten Glassy-Carbon-Elektroden von der HRP-Menge (Polarisierung -100 mV vs. Ag/AgCl ; A : ca. $7,0\text{ mm}^2$; H_2O_2 -Konzentration: $200\text{ }\mu\text{M}$)

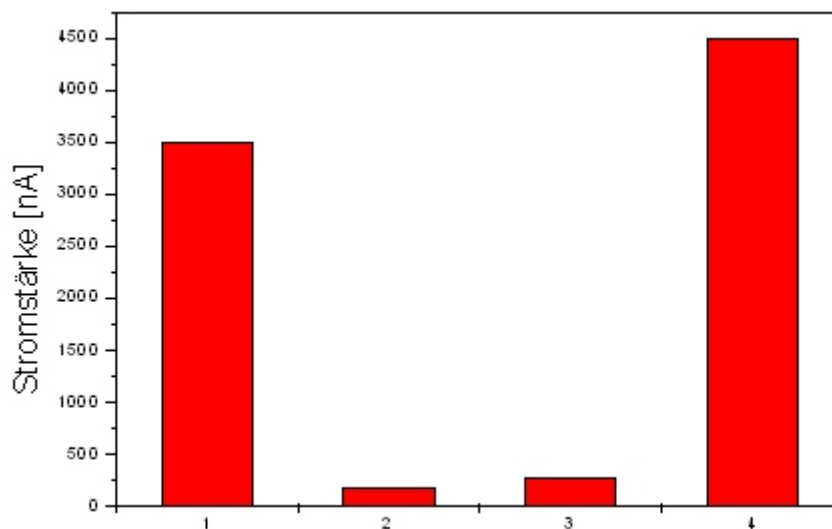
4.1.8 Untersuchungen zur Stabilität von HRP-Elektroden

4.1.8.1 Arbeitsstabilität von HRP-Elektroden hinsichtlich der Messung mit Mediator

Die Praxistauglichkeit enzymatischer Biosensoren wird häufig von der Stabilität der verwendeten Proteine bestimmt [109]. Bei den hier untersuchten HRP-Sensoren muß darüber hinaus zwischen dem Signal durch direkten Elektronentransfer sowie dem Signal bei Einsatz des Mediators unterschieden werden. Während die Stromstärke bei Einsatz des Mediators die Gesamtaktivität der Enzymschicht wiedergeben kann, läßt der direkte Elektronentransfer eine Aussage über die Aktivität der unmittelbar an der Elektroden-Oberfläche befindlichen HRP zu. Die Stabilität der in dieser Arbeit hergestellten HRP-Elektroden wurde experimentell überprüft, indem die enzymatische Aktivität hinsichtlich des direkten Elektronentransfers bzw. mit Mediator ermittelt und die polarisierten Elektroden jeweils im Meßaufbau belassen wurden. Die Signalintensität wurde dann im Dauertest über mehrere Stunden gemessen. Eine exponentielle Abnahme der Stromstärken sowohl hinsichtlich des direkten Elektronentransfers als auch bei Mediatorumsatz war die Folge. Als Erklärungsmöglichkeit kamen nicht nur der Verlust an katalytischer Aktivität, sondern auch der Verbrauch von Substrat bzw. Mediator in Betracht. Deshalb wurden die jeweiligen Stoffe nach den Dauertests erneut in den anfänglichen Konzentrationen zugegeben. Das Substrat Wasserstoffperoxid an sich war unter den Bedingungen im Meßaufbau metastabil, der Eigenzerfall des Mediators in diesem zeitlichen Rahmen senkte die Konzentration an Hydrochinon nicht signifikant ab.

Exemplarisch wird die Arbeitsstabilität an einer beschichteten ($200\text{ }\mu\text{g HRP}_{\text{nat}}$) Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode gezeigt. Der ursprüngliche Mediatorstrom sank im Verlauf 14stündiger Dauerpolarisierung kontinuierlich auf unter 10 % ab. Während dann der Zusatz von Hydrochinon nur eine sehr geringe Steigerung der Stromstärke erbrachte, wurde durch die weitere Addition des Substrats Wasserstoffperoxid ein Signal erzielt, das das anfängliche sogar noch übertraf (Abb. 4.46). Die Abnahme der Stromstärke während der stundenlangen Dauerpolarisierung war also ausschließlich auf den fortlaufenden Umsatz des Substrats durch die immobilisierte HRP zurückzuführen, das H_2O_2 war nach 14 Stunden verbraucht, was unter Berücksichtigung der Wasserstoffperoxidmenge und der Enzymbeladung plausibel ist. Die Konzentrationen von Hydrochinon und Wasserstoffperoxid befanden sich jeweils im Sättigungsbereich, wie eine vorherige Messung mit einer gleich beschichteten Elektrode ergeben hatte.

Die Messung mit Mediator und dem Substrat H_2O_2 zeigte auch, daß die enzymatische Aktivität der Proteinschicht insgesamt durch das Wasserstoffperoxid nicht beeinträchtigt worden war. Die



native HRP zeigte sich also gegenüber der hier verwendeten Konzentration an Abb. 4.46: Erzielte Stromstärken mit Mediator bei Substratsättigung mit einer HRP_{nativ} -Elektrode (Elektrodag 423-SS) bei Dauerpolarisierung von -100 mV vs. Ag/AgCl (1: anfängliche Stromstärke mit Mediator (HQ [1 mM], H_2O_2 [5 mM]); 2: verbliebene Stromstärke nach 14 h; 3: nach Zugabe HQ [1 mM]; 4: nach Zugabe H_2O_2 [5 mM])

Wasserstoffperoxid nicht anfällig, die Arbeitsstabilität für diesen Zeitraum - unter diesen Bedingungen - war also gegeben. Die Ergebnisse mit anderen Elektrodag- und Glassy-Carbon-Sensoren bestätigten den gleichbleibenden Erhalt der Enzymaktivität der immobilisierten Schicht insgesamt bei Dauermessung über mehrere Stunden.

4.1.8.2 Arbeitsstabilität des direkten Elektronentransfers bei HRP-Elektroden

Bei der Untersuchung der Arbeitsstabilität des direkten Elektronentransfers wurde im Gegensatz dazu bei Dauerpolarisierung über Nacht meist ein völliger Verlust der katalytischen Aktivität festgestellt. Dies galt auch bei Verwendung von Glassy-Carbon-Elektroden und bei Coimmobilisierung des Additivs Dextran-Sulfat. Ebenso zeigte sich bei Beschichtung mit rekombinanter HRP ein kompletter Verlust des direkten Elektronentransfers im Verlauf mehrerer Stunden. Dieser Befund deckt sich mit obig erwähnten Beispielen aus der Literatur, die bei anderen Untersuchungen eine relativ geringe Arbeitsstabilität von auf direktem Elektronentransfer basierenden Sensoren dokumentieren. Zwei nacheinander durchgeführte Meßreihen mit einer mit nativer HRP beschichteten Dickschicht-Elektrode zeigten eine deutliche Reduktion des direkten Elektronentransfers (Abb. 4.47). Der Sensor war 24 Stunden

vorher beschichtet worden und wurde bis zum Einsatz in KPi bei 4°C dunkel gelagert.

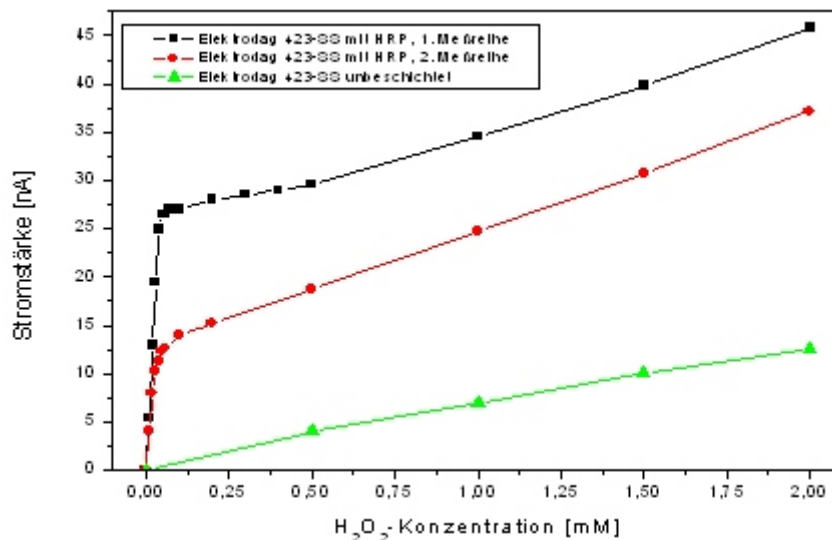


Abb. 4.47: Direkter Elektronentransfer für eine mit nativer HRP beschichteter Elektrode 423-SS - Elektrode bei zwei nacheinander durchgeführten Meßreihen sowie vorheriger Ermittlung der Blindwerte ohne Enzymbeschichtung

Man erkennt eine Reduktion der Stromausbeuten bei Sättigungskonzentration und auch im linearen Bereich, was eindeutig für eine Schädigung der Enzyme bzw. der Graphitoberfläche bei Depolarisierung der Elektrode spricht. Während der Durchführung der ersten Meßreihe, während der der Sensor ja dauernd polarisiert wurde, war ein Abfall der Stromstärken bei Wasserstoffperoxid-Zugabe nicht beobachtet worden, d.h. die Stromstärke blieb zwischen den Substrat-Zugaben auf dem Niveau und wurde durch die Zugaben nur gesteigert. Eine Schädigung durch die Messung konnte also ausgeschlossen werden. Der Sensor war zwischen den beiden Meßreihen nicht getrocknet worden.

In der Abbildung 4.47 ist weiterhin die zuvor aufgenommene Meßreihe mit blanker, unbeschichteter Elektrode eingetragen, die Steigung der Geraden entsprach in etwa der Steigung der Stromstärken dieser Elektrode mit Enzymbeschichtung bei weiterer Zugabe des Substrats H₂O₂ nach Erreichen der Sättigungskonzentration. Die Zunahme der Stromstärke in diesem Bereich war daher durch elektrochemischen Umsatz des Wasserstoffperoxids an der Elektrodenoberfläche begründet. Eine Diffusionshemmung durch die Beschichtung ist nach diesen Resultaten nicht gegeben.

Der Aus- bzw. Wiedereinbau eines Sensors mit rekombinanter Peroxidase (32,5 µg) hatte von der ersten zur zweiten Messung des direkten Elektronentransfers bei Substratsättigung (200 µM

H₂O₂) einen Abfall von 40 auf 28 nA zur Folge, der Sensor lagerte zwischenzeitlich für ca. eine Stunde im Puffer (Abb. 4.48).

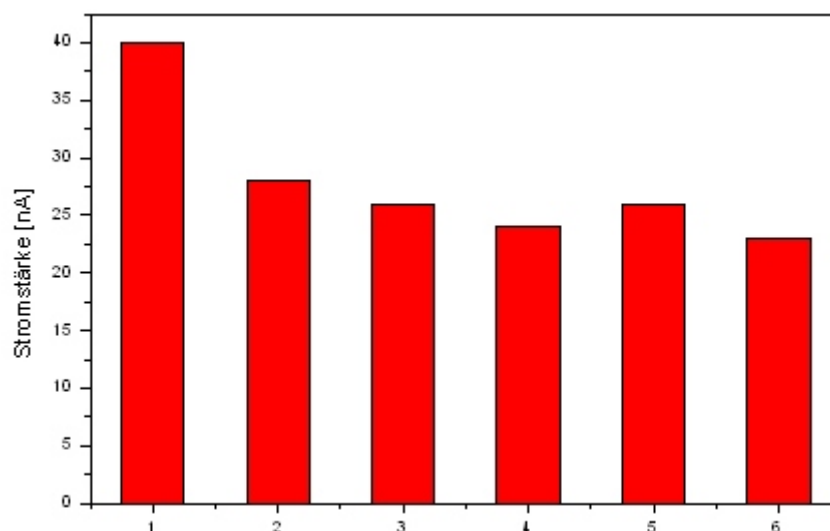


Abb. 4.48: Erzielte Stromstärken für direkten Elektronentransfer mit einer mit rekombinanter HRP (32,5 µg) beschichteten Elektrode 423-SS - Dickschicht-Elektrode bei sechs nacheinander durchgeführten Messungen (200 µM H₂O₂)

Der Abfall des Signals des direkten Elektronentransfers von der zweiten zur sechsten Messung war nur gering, die sechste Messung erbrachte immerhin noch ein Signal von 23 nA. Diese Messungen waren mit jeweils zehnminütiger Unterbrechung durchgeführt worden, unterdessen lagerten die Sensoren ebenfalls im KPi-Puffer. Wie bei Messung mit nativer HRP zeigte sich also auch bei der rekombinanten HRP ein signifikanter Abfall der Stromstärke durch Ein- und Ausbau, zumindest nach der ersten Meßreihe.

4.1.8.3 Lagerstabilität von HRP-Biosensoren

Auch bei der Lagerstabilität von HRP-Elektroden wurden Unterschiede beobachtet, wenn die Elektroden in Kombination mit Hydrochinon als Mediator oder aber mit H₂O₂ alleine (direkter Elektronentransfer) verwendet wurden. In Kombination mit dem Mediator konnten die Elektroden problemlos für längere Zeit in Puffer gelagert werden, der überwiegende Teil des immobilisierten Enzyms behielt also seine Aktivität.

Bei den Messungen alleine mit H₂O₂ wurden unveränderte Signale nur dann beobachtet, wenn die Elektrode mit dem Enzym trocken gelagert und erst kurz vor Gebrauch mit der UV-Paste

beschichtet wurde. Wurde sie bereits vor der Lagerung mit der Membran versehen, waren die resultierenden Signale erniedrigt. Wurden bereits benutzte Sensoren noch gelagert, nahmen die Signale deutlich ab bzw. war kein Signal mehr erhältlich.

4.1.9 Interpretation der praktischen Ergebnisse mit Hilfe der Modellierung des direkten Elektronentransfers für native und rekombinante HRP

Die Wahrscheinlichkeit des direkten Elektronentransfers hängt dem Marcus-Theorem zufolge in erster Linie von der Distanz des aktiven Zentrums zur Elektrodenoberfläche ab, wobei mit zunehmendem Abstand die Elektronentransferrate exponentiell abnimmt [24]. Generell sind die aktiven Zentren von Enzymen tief innerhalb der globulären Struktur lokalisiert, bei der HRP ist dies nicht anders. Der direkte Elektronentransfer sollte im Falle der rekombinanten HRP gegenüber dem nativen Protein begünstigt sein, da die Kohlenhydratseitenketten fehlen und deshalb der Abstand vom aktiven Zentrum zur Elektrodenoberfläche geringer ausfällt.

Mit Hilfe des Programms etunnel [84] wurden innerhalb der Abt. Strukturforschung der GBF die Elektronentransferraten für die native sowie die rekombinante HRP berechnet. In der Simulation wurde die gesamte 3-D-Struktur des Proteins einschließlich der Glykosylierung berücksichtigt, die sterische Anordnung der einzelnen Atome und Bindungen sowie insbesondere die Packungsdichte bestimmen die möglichen Elektronentransferwege („Pathways“) im Protein. Es ergibt sich als Resultat der berechneten Transferraten eine farbige Darstellung der Proteinoberfläche, deren Kolorierung auf die Möglichkeit des Transfers schließen läßt. Eine intensive Rotfärbung bedeutet eine hohe Transferrate, wogegen eine Blaufärbung eine niedrige Rate anzeigt (Abb. 4.49a).

Berechnet wurde die Möglichkeit des direkten Elektronentransfers für die native HRP in Lösung („nass“), für die native HRP im Vakuum („trocken“) sowie die rekombinante HRP (Abb. 4.49b). Dargestellt sind in der GRASP-Simulation (Abb. 4.49a) die roten und blauen Oberflächenbereiche hoher bzw. niedriger Elektronentransferraten. Die gezeigten Orientierungen relativ zur Graphitoberfläche entsprechen denen der sich bei den Docking-Berechnungen am häufigsten ergebenden Ausrichtungen. Bei der nativen HRP in Lösung ergab sich generell eine relativ große Distanz vom aktiven Zentrum zur Proteinoberfläche, da die acht Kohlenhydratseitenketten im Wasser abstehen und damit ein zusätzlicher Abstand der Aminosäurekette von der Elektrodenoberfläche resultiert. Die Simulation der nativen HRP im Vakuum ergab dagegen ein enges Anliegen der Kohlenhydratseitenketten an das Protein, was gegenüber dem rekombinanten Protein nur einen geringen Unterschied hinsichtlich der Gesamtgröße bedeutete. Die Berechnung im Vakuum sollte der Proteinkonformation entsprechen, die sich bei Immobilisierung des nativen Enzyms durch Trocknung - dem damit

verbundenem Verlust des umgebenden Wassers - und anschließender Fixierung durch die aushärtende Paste ergeben könnte. Die Betrachtung der die Elektronentransferraten widerspiegelnden Färbungen der Oberflächen der drei berechneten Varianten der HRP zeigt bestimmte Bereiche, die je nach ihrer Entfernung vom aktiven Zentrum unterschiedlich starken Elektronentransfer ermöglichen (Abb. 4.49a). Begünstigt ist der direkte Elektronentransfer vor allem im Bereich des geringeren Umfanges des ellipsoiden Proteins, da hier die Distanz zur Häm-Gruppe im aktiven Zentrum relativ gering ist. Hinsichtlich des Elektronentransfers der rekombinanten HRP ergab sich im Eingangsbereich zum aktiven Zentrum eine bestimmte Domäne, die in bezug auf die übrigen Oberflächenbereiche mit einer berechneten Elektronentransferrate von $10^9/s$ favorisiert ist. Die gegenüberliegende Seite weist mit $10^5/s$ (Arg 159) und $10^3/s$ (Gln271) zwar die Möglichkeit für hohe Transferraten auf, die im Vergleich aber geringer sind. Die niedrigsten Transferraten ergaben sich für das C-terminale Ende mit Werten niedriger als $10^{-2}/s$. Diese Resultate stehen größenordnungsmäßig im Einklang mit neuesten experimentellen Untersuchungen [124, 125]. Beim nativen Enzym in Lösung („nass“) waren die Elektronentransferraten über die abstehenden Kohlenhydratreste mit Werten kleiner als $10^{-10}/s$ wie erwartet viel geringer.

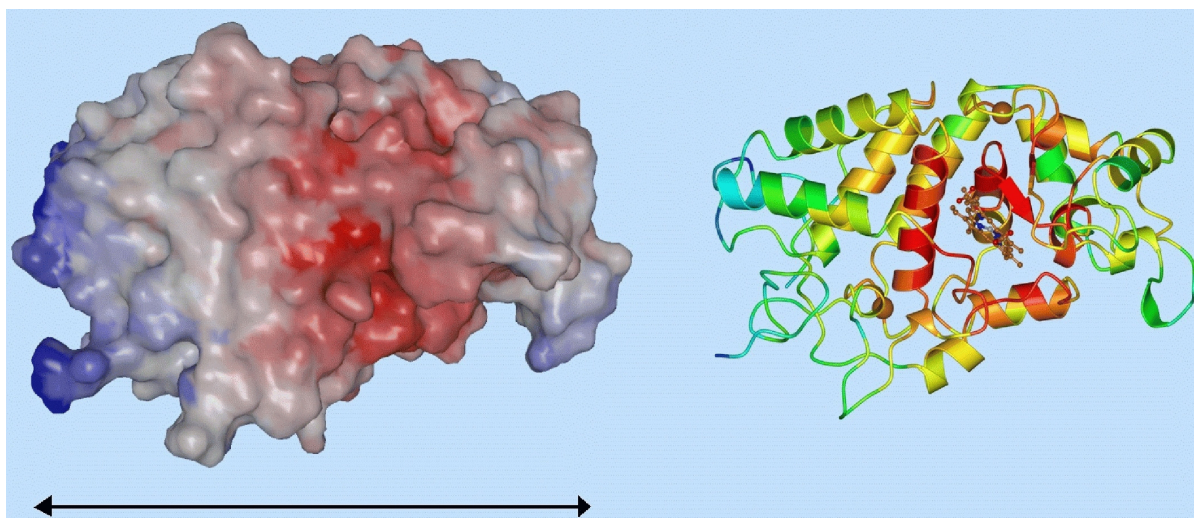


Abb. 4.49a: GRASP-Darstellung der berechneten Elektronentransferraten vom aktiven Zentrum der (rekombinanten) HRP zur Proteinhülle (rot - hohe Transferrate, blau - niedrige Transferrate). Der Pfeil gibt die Bezugsachse der Berechnungen an („long ellipsoid axis“; die zweite Bezugsachse „short ellipsoid axis“ ist senkrecht zu dieser sowie zur Papierebene zu sehen) [Abbildung erstellt von Dr. Hans-Jürgen Hecht]

Weiterhin bestimmt die modellierte Orientierung des Enzyms relativ zur Elektrodenoberfläche

in Kombination mit den jeweiligen Elektronentransferraten den Umfang des direkten Elektronentransfers, je nachdem, welche Bereiche der Proteinoberfläche bevorzugt zur Elektrodenfläche gerichtet sind. Die Berechnung der unterschiedlichen Orientierungen von je 100 der drei Enzymvarianten aus zufälligen Startorientierungen ergab hinsichtlich ihrer Quer- und Längsachsen eine annähernd statistische Verteilung (Balkendiagramme in Abb. 4.49b). Eingang in die Berechnungen fanden hydrophobe, hydrophile und elektrostatische Interaktionen zwischen Protein und Graphitoberfläche, wobei die hydrophoben Wechselwirkungen aus Gründen der Möglichkeiten des Rechenprogrammes stärker gewichtet waren. Die letztlich sich ergebende Ausrichtung des Enzyms wurde durch die unterschiedlichen Affinitäten der Proteinoberflächen zur Graphitoberfläche bestimmt.

Als Resultat der Berechnungen ergab sich, daß in allen drei Varianten die HRP nicht rein statistisch zur Elektrodenoberfläche orientiert ist, sondern bevorzugte Orientierungen zeigt. Dabei unterschieden sich die häufigsten Orientierungen der drei Enzymvarianten voneinander, was durch den Einfluß der Glykosilierung begründet war.

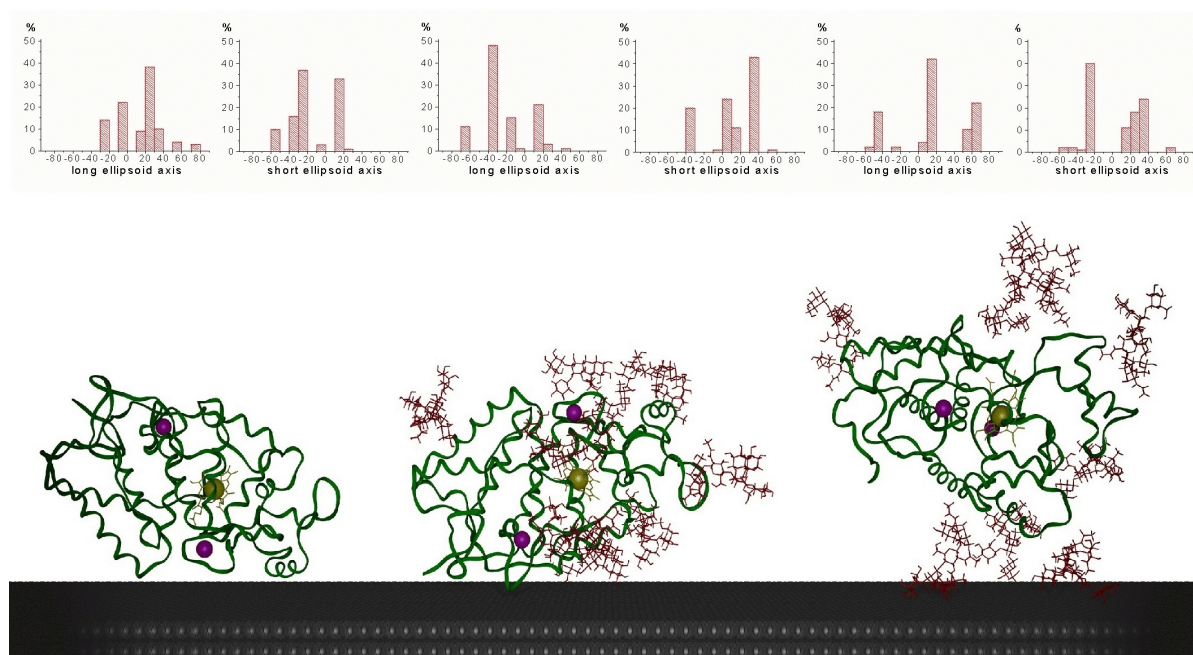


Abb. 4.49b: Darstellung der berechneten Elektronentransferwege für rekombinante HRP (links), „trockene“ native HRP (Mitte) und „nasse“ native HRP (rechts); Calcium-Ionen sind magenta, Eisen gelb, Zuckerreste rot und das Häm grau eingefärbt (Darstellung mit Bragi [92]). Die Balkendiagramme repräsentieren die Verteilung der verschiedenen Orientierungen (Winkel der jeweils angegebenen Achse zur Graphitoberfläche), die sich aus den Autodock-Berechnungen relativ zur Oberfläche ergab [Abbildung erstellt von Dr. Hans-Jürgen Hecht]

Eine bevorzugte Orientierung der unglykosilierten HRP ergab sich parallel zur ihrer Längsachse relativ zur Elektrodenoberfläche. Der direkte Elektronentransfer sollte beim rekombinanten Enzym also effizient sein, da die aufliegenden Bereiche auch diejenigen sind, die eine hohe Elektronentransferrate aufweisen. Dagegen zeigten die Berechnungen für das glykosilierte Enzym in Lösung („nass“), daß die HRP mit ihren abstehenden Kohlenhydratseitenketten an die Elektrode dockt, die ohnehin relativ schlecht Elektronentransfer ermöglichen und außerdem eine große Distanz des aktiven Zentrums hin zur Elektrode bedingen. Für die native HRP in Lösung ergaben sich deshalb sehr geringe Elektronentransferraten von $10^{-10}/s$, der direkte Elektronentransfer ist hier also stark reduziert. Für die bei den Berechnungen am häufigsten auftretende Orientierung ergab sich ein relativ großer Abstand vom aktiven Zentrum zur Elektrode von 35 Å. Die native, im Vakuum simulierte HRP („trocken“) dockte in allen berechneten Ausrichtungen jeweils in Kombination mit Aminosäureresten und Kohlenhydratseitenketten an die Elektrodenoberfläche, die bevorzugten Orientierungen ergaben Abstände des aktiven Zentrums von 30 Å und 23 Å. Der letztere Wert entspricht in etwa dem von 20 Å, der sich beim rekombinanten Enzym für die hauptsächlich erhaltenen Ausrichtungen ergab. Wegen der fast gleich großen Distanzen sollten ähnliche Transferraten für die rekombinante sowie native Form des Enzyms resultieren, sofern die Kohlenhydratreste tatsächlich in der Immobilisierungsmatrix nicht vom Aminosäuregrundgerüst abstehen.

Die praktischen Messungen des direkten Elektronentransfers für Dickschicht-Elektroden gleicher Massenbeladung an rekombinanter und nativer HRP hatten Stromstärken in gleicher Größenordnung erbracht (Abschnitt 4.1.5.1). Zwar wurden bei Sättigungskonzentrationen von Wasserstoffperoxid hinsichtlich des direkten Elektronentransfers generell etwas höhere Werte für die native HRP erhalten, dennoch korrespondieren diese Resultate mit den Computermodellierungen für die rekombinante HRP und die native HRP im Trockenzustand, denn die (massen-)spezifischen Aktivitäten beider Peroxidasen in Lösung waren vergleichbar hoch gewesen (HRP_{rec} ca. 70 % von HRP_{nat} ; Abschnitt 4.1.2.1). Das Immobilisierungsprotokoll führte zur Trocknung der Enzymschichten, die dann mit der aushärtenden Paste fixiert wurden. Ausgeschlossen werden kann für die auf diese Weise hergestellten Sensoren jedenfalls die Variante der nativen HRP in Lösung, da hiermit gegenüber der unglykosilierten HRP kaum meßbare Ströme die Folge gewesen wären. Untersuchungen in dieser hier vorliegenden Arbeit hinsichtlich direkten Elektronentransfers von nativer HRP in Lösung hatten auch tatsächlich keine meßbaren Ströme gegenüber Messungen in enzymfreier Lösung erbracht (nicht gezeigt). Bei anderen Untersuchungen jedoch, bei denen die native Peroxidase nur durch Adsorption in Flüssigkeit an die Elektrode gekoppelt wurde, wurden Ströme erhalten, die der Simulation der nativen HRP im Vakuum („trocken“) entsprachen [125, 126].

Wendet man den aus den Faradayschen Gesetzen abgeleiteten Zusammenhang zwischen der

gemessenen Stromstärke und den dabei übertragenen Elektronen (siehe Abschnitt 2.2.1) für die praktischen Resultate des direkten Elektronentransfers der hier vorliegenden Arbeit an, so kann die durchschnittliche Elektronentransferrate der involvierten Enzymmoleküle abgeschätzt werden. Angenommen wurden bei der Berechnung völlig glatte Sensoroberflächen sowie eine homogene Verteilung der HRP-Enzyme darauf. Es wurde weiterhin vorausgesetzt, daß nur die Enzyme im - angenommenen - Monolayer am direkten Elektronentransfer partizipieren, wie es auch die obigen Resultate der simulierten Elektronentransferraten aussagen. Die Proteingrößen des nativen und rekombinanten Enzyms wurde analog der Resultate in Abschnitt 4.1.1.3 aufgefaßt und die HRP dabei angenähert als Kugel angesehen. Von einer vollständigen Bedeckung der Elektrodenoberfläche sowie gleichen Bedingungen hinsichtlich direkten Elektronentransfers über die gesamte Fläche wurde ausgegangen. Als Ergebnis dieser Abschätzung wurden für drei ausgewählte HRP-beschichtete Elektroden ohne Additive Elektronentransferraten erhalten, die größenordnungsmäßig mit obigen Modellrechnungen korrespondieren (Tabelle 4.1).

Die experimentellen Ergebnisse belegen auch ähnlich hohe Transferraten für die native und rekombinante HRP, so daß von anliegender Glykosilierung der nativen HRP in der Enzymschicht ausgegangen werden kann. Geht man von einer im mikroskopischen Bereich großen Rauigkeit aus, erniedrigen sich entsprechend die berechneten Transferraten, da die effektive Elektrodenoberfläche größer ausfällt als bei der hier angenommenen ebenen Kreisfläche. Der Vergleich von nativ zu rekombinant bleibt davon jedoch unberührt. Mit Glassy-Carbon-Elektroden waren höhere Stromstärken gemessen worden als mit Dickschicht-Elektroden, was auf eine verbesserte Möglichkeit des direkten Elektronentransfers mit diesem Material hindeutet; die Rauigkeit im mikroskopischen Bereich war mit Sicherheit geringer.

<i>Elektrodentyp</i>	<i>Stromstärke bei Substratsättigung [μA]</i>	<i>berechnete Elektronentransferrate [s^{-1}]</i>
<i>Elektrodag 423-SS, HRP_{nativ}</i>	70	384
<i>Elektrodag 423-SS, HRP_{rec}</i>	50	274
<i>Glassy-Carbon, HRP_{nativ}</i>	358	1953

Tabelle 4.1: Berechnete Elektronentransferraten aus den experimentellen Resultaten hinsichtlich direkten Elektronentransfers für polierte, HRP-beschichtete Elektroden der jeweils höchsten erreichten Stromstärken

4.1.10 Diskussion der Resultate mit Peroxidase-Elektroden hinsichtlich direkten Elektronentransfers

In Tabelle 4.2 sind wichtige Eigenschaften ausgewählter untersuchter HRP-Sensoren hinsichtlich direkten Elektronentransfers verzeichnet. Alle Elektroden waren mit Enzymlösung beschichtet und nach Trocknung mit UV-Paste überzogen worden, die dann fixiert wurde und so die Peroxidase auf den Graphitoberflächen immobilisierte.

Das maximale Signal entspricht der Stromstärke, die infolge des direkten Elektronentransfers bei H_2O_2 -Sättigung erhalten wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten auf die Flächeneinheit mm^2 normiert. Die Enzymbeladungen der hier ausgewählten Sensoren befanden sich im Sättigungsbereich des direkten Elektronentransfers hinsichtlich der Proteinbeschichtung. Die angegebenen Sensitivitäten der Elektroden waren in vielen Fällen schwierig zu bestimmen, mit Abweichungen im zweistelligen Prozentbereich muß daher gerechnet werden. Insgesamt waren die erzielten Stromstärken mit polierten Elektroden signifikant höher als mit unbehandelten. Der Vergleich der ermittelten Werte zeigt, daß die höheren Stromausbeuten bei polierten Elektroden 423-SS - Dickschicht-Elektroden erhalten wurden, wenn als Additiv - je 30 % w/w - Dextran-Sulfat zur nativen oder Polyethylenimin zur rekombinanten HRP zugesetzt wurde. Dann entsprach die erhaltene Stromstärke bei Substratsättigung ungefähr der für Glassy-Carbon ($\text{HRP}_{\text{nativ}}$ ohne Additiv), wobei die hier ausgewählte Glassy-Carbon Elektrode die mit dem höchsten Signal war.

Berücksichtigen muß man beim Vergleich der Elektroden mit Glassy-Carbon sicherlich auch die unterschiedlich hohen Enzymbeladungen, ab denen die Stromstärken des direkten Elektronentransfers nicht mehr steigerbar waren. Sie lag mit (etwa) $5 \mu\text{g HRP} / \text{mm}^2$ für die unbehandelten Dickschicht-Sensoren um eine Größenordnung höher als mit ungefähr $0,4 \mu\text{g HRP} / \text{mm}^2$ für die Glassy-Carbon-Elektroden. Begründet ist dies sehr wahrscheinlich in dem Polierverfahren bei den Dickschicht-Sensoren, mit dem eine Glätte wie beim Glassy-Carbon-Material nicht zu erreichen war. Man muss für letztere Elektroden eine im mikroskopischen Bereich glattere Oberfläche voraussetzen, die effektive elektrochemische Aktivität der Elektrodenpasten ist daher nicht direkt mit ihnen vergleichbar. Die Eignung des Elektrodenmaterials Glassy-Carbon gegenüber den Dickschicht-Sensoren fällt daher unter Berücksichtigung der abgeschätzten Elektronentransferraten (siehe 4.1.9) noch günstiger aus, da aufgrund der bei niedrigeren Enzymbeschichtungen erreichten vollständigen Bedeckung die verminderte Rauigkeit belegt ist. Die Transferraten für die Elektroden müßten also - pro Flächeneinheit - noch geringer ausfallen, da bei der Abschätzung von einer absolut ebenen Fläche ausgegangen wurde.

Elektrode (Typ)	Beschichtung [$\mu\text{g HRP} / \text{mm}^2$]	max. Signal [nA/mm²]	Linearität bis [$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$]	Sensitivität [($\mu\text{A}/\text{mM H}_2\text{O}_2$)mm⁻²]	Ansprech- zeit [s]
421-SS	40 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$	6,6	500	0,01	300
423-SS	6,1 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$	6	35	0,16	120
423-SS	6,1 $\mu\text{g HRP}_{\text{rec}}$	4,7	35	0,13	10
423-SS	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$ 50% Gafquat 755N	14	30	0,2	60
423-SS	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{rec}}$ 50% Gafquat 755N	13,4	30	0,23	5
423-SS (p.)	29 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$	10	120	0,08	120
423-SS (p.)	1,4 $\mu\text{g HRP}_{\text{rec}}$	7,4	12,5	0,43	30
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$ 30% Dextran-Sulfat	50	50	0,68	5
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{rec}}$ 30% Dextran-Sulfat	25	90	0,16	250
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$ 30% PEI	21	50	0,41	150
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{rec}}$ 30% PEI	51	100	0,14	20
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$ 50% Dextran	14	90	0,14	300
423-SS (p.)	4,6 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$ 50% DEAE-Dextran	18,6	50	0,29	300
Glassy- Carbon	1,8 $\mu\text{g HRP}_{\text{nativ}}$	51	90	0,47	10

Tabelle 4.2: Charakteristische Daten ausgewählter untersuchter HRP-Elektroden (“(p.)” bedeutet poliert, die Additivanteile sind als % w/w [Enzymmasse + Additivmasse] angegeben)

Die linearen Bereiche für die einzelnen Sensoren schwankten innerhalb einer Größenordnung, vermutliche Ursachen sind zum einen Diffusionseinflüsse sowie auch die Schwierigkeit, bei den vorliegenden Meßwerten die obere Grenze des linearen Bereiches jeweils exakt zu bestimmen. Bei einer tatsächlichen analytischen Anwendung würde diese Problematik sicher entfallen, da die Signale eines dann angeströmten Sensors eindeutig reproduzierbaren Diffusionseinflüssen unterliegen würden.

Wesentlich interessanter erscheinen dagegen die Ansprechzeiten der Sensoren, auch sie stellen ein wichtiges Kriterium für die Einsetzbarkeit eines Sensors dar. Die Einstellung des Signals in wenigen Sekunden war generell sowohl mit nativer als auch rekombinanter Peroxidase möglich. In der Regel war dies bei den Elektrodeag-Elektroden mit nativer HRP mit den Additiven Gafquat 755N oder auch Dextran-Sulfat, bei der rekombinanten HRP mit Polyethylenimin zu erreichen. Aufgrund der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen (Abschnitte 4.1.5.5 - 4.1.5.6) dürfte die Ursache eine die Diffusion in der Membran begünstigende Struktur der Enzym-Additiv-Schicht sein, die sich beim Adsorptions- oder Trockenvorgang ausbildet. Eine Begünstigung des direkten Elektronentransfers durch die verwendeten Additive, also ein erleichterter Elektronenübergang von der Elektrodenoberfläche (möglicherweise über das Additiv) zum Enzym, ist nicht erkennbar. Bei einer Beschleunigung der Regeneration der HRP durch den direkten Elektronentransfer als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt müßte die Folge eine Vergrößerung des linearen Bereiches sein, was nicht eindeutig nachweisbar ist.

Zwar schwanken die oberen Grenzen für die linearen Bereiche, jedoch zeigt der Vergleich der Sensoren mit Gafquat 755N als Additiv zu den beiden Enzymvarianten keine Unterschiede zu denen ohne Additiv. Die höheren Stromstärken infolge direkten Elektronentransfers wurden im Falle der nativen und rekombinanten HRP durch Gafquat 755N sowie Dextran-Sulfat offensichtlich durch stabilisierende Einflüsse hervorgerufen. Als Resultat waren pro Flächeneinheit mehr Enzyme katalytisch aktiv und bewirkten einen höheren Stromfluß. Die hier ermittelten linearen Bereiche für die Abhängigkeit des direkten Elektronentransfers von der H_2O_2 -Konzentration decken sich mit denen aus anderen Untersuchungen [4, 127].

Die mit den hier vorgestellten HRP-Elektroden erzielten Sensitivitäten und erreichten Stromstärken fielen durchweg um ein bis zwei Größenordnungen geringer aus als bei anderen bekannten Untersuchungen aus der Literatur mit festen Kohlenstoffmaterialien [119]. Mit thermischer oder chemischer Vorbehandlung waren die Signale bei spektrographischen Graphitstäben weiterhin steigerbar. Es ergaben sich für dieses Material Stromstärken im H_2O_2 -Sättigungsbereich von $1,1 \mu\text{A} / \text{mm}^2$, für Glassy-Carbon wurden $2,8 \mu\text{A} / \text{mm}^2$ erzielt. Mit einer speziellen kohlenstoffhaltigen Tinte und eingemischter HRP, welche siebgedruckt eingesetzt wurde, waren Stromstärken von $0,55 \mu\text{A} / \text{mm}^2$ gemessen worden [128]. Stromstärken in gleicher Größenordnung wie mit den in der hier vorliegenden Arbeit erzielten wurden mit HRP-

Elektroden aus pyrolytischem Graphitpulver und Graphitfarbe ($6 \text{ nA} / \text{mm}^2$ [129]) und auch mit solchen aus Graphitpulver und Silikonpaste ($1,7 - 5 \text{ nA} / \text{mm}^2$ [127]) erhalten. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß immer berücksichtigt werden, daß die tatsächlichen Rauigkeiten der verwendeten Materialien voneinander abweichen können. Dadurch sind nicht alle Resultate direkt miteinander vergleichbar, eine Aussage über die Eignung eines Materials hinsichtlich direkten Elektronentransfers nur bedingt möglich. Gemessen wird immer nur eine Stromstärke, die bestimmt wird durch die tatsächlich elektrochemisch aktive Fläche und des Umfanges des direkten Elektronentransfers pro adsorbiertem HRP-Molekül. Außerdem können die spezifischen Aktivitäten der eingesetzten Peroxidasen differieren, ebenso waren die verwendeten Puffer wie auch die angelegten Potentiale nicht bei allen Untersuchungen identisch. Dennoch läßt sich ableiten, daß bei den angeführten Zitaten die höheren Stromstärken mit den elektrochemisch sehr aktiven Materialien und sehr engem Kontakt zum Enzym realisiert wurden. Die Elektroden mit Binderpasten aus beispielsweise Silikon bieten vermutlich inhomogene Oberflächen, die nicht so elektrochemisch aktiv bzw. leitend wie reine Materialien sind.

4.2 Bioprozessanalytik und -regelung mit GOD-Sensoren im FIA-System

Die in dieser Arbeit entwickelten HRP-Elektroden boten nicht die notwendigen Signalstärken bzw. Standzeiten, um sie - kombiniert mit einem angepassten GOD-Gehalt in der UV-Pastenmembran - als Detektionseinheiten in der Bioprozessanalytik einzusetzen. Deshalb wurde auf Dickschichtsensoren zurückgegriffen, deren klassisches Detektionsprinzip die Oxidation von Wasserstoffperoxid als dem Produkt der selektiven enzymatischen Katalyse ist. Als GOD- (bzw. LOD-) Dickschichtelektroden wurden solche mit Platinschichten verwendet, die gut zur elektrochemischen Detektion von H_2O_2 geeignet sind. Zunächst wurden die unbeschichteten Elektroden mit zyklischer Voltametrie auf Potential sowie Reproduzierbarkeit hinsichtlich H_2O_2 -Umsatz untersucht. Nach Dauertests wurden die enzymbeschichteten Sensoren zum Bioprozessmonitoring bei Kultivierungen von *Aspergillus niger* sowie tierischen Zellen eingesetzt, wobei die verwendeten FIA-Apparaturen charakterisiert wurden.

4.2.1 Charakterisierung der GOD-Sensoren

4.2.1.1 Eignung der Platin-Dickschicht-Elektroden zur Messung von H_2O_2

Die Immobilisierung von Oxidasen in Membranen auf Platin-Dickschicht-Elektroden hat den elektrochemischen Nachweis von Wasserstoffperoxid zum Ziel, um durch die Quantifizierung

des resultierenden Stromflusses indirekt die Konzentration eines bestimmten Analyten, nämlich des Substrats der Oxidase, zu bestimmen. Das gewählte Arbeitspotential zur Oxidation von Wasserstoffperoxid als Produkt der enzymatischen Katalyse sollte im Plateaubereich dieser Reaktion liegen. In diesem Bereich ist eine Änderung des resultierenden Stromflusses bei geringen Schwankungen des Potentials ausgeschlossen bzw. minimal, da der Stofftransport limitierend ist [57]. Aufgenommen wurden zyklische Voltamogramme mit einer Platin-Dickschicht-Elektrode in KPi-Puffer (0,1 M, pH 7,5) mit einer Scan-Rate von 100 mV/s. Das Vorlagengefäß wurde bei 20°C thermostatisiert. Durch sukzessive Zugabe von konzentrierter H_2O_2 -Lösung wurde die Wasserstoffperoxid-Konzentration gesteigert, entsprechend stiegen die registrierten Stromstärken (Abb. 4.50). Höhere H_2O_2 -Konzentrationen ab 80 μM führten zur Bildung von Gasblasen aus entstandenem Sauerstoff und zur Störung der Messungen.

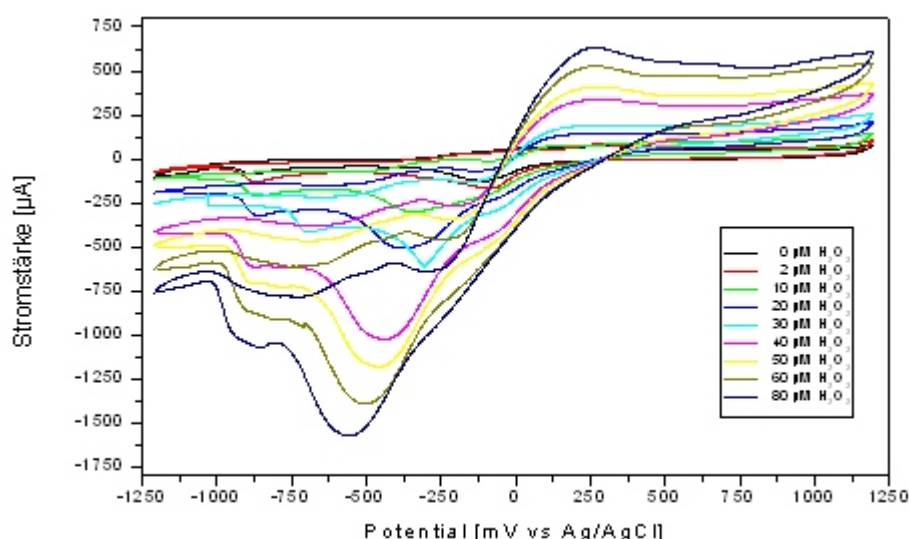


Abb. 4.50: Zyklische Voltamogramme mit einem Platin-Dickschicht-Sensor bei unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen (in KPi-Puffer pH 7,5)

Der Plateaubereich für die Oxidation erstreckte sich von etwa +350 bis +1000 mV mit Ag/AgCl als Referenz, was die annähernd identischen Stromflüsse bei ausgewählten Potentialen in diesem Intervall zeigen (Abb. 4.51). Bis zu einem H_2O_2 -Gehalt von 30 μM wurden bei ausgewählten Potentialen in diesem Bereich Korrelationskoeffizienten besser als $r = 0,997$ ermittelt.

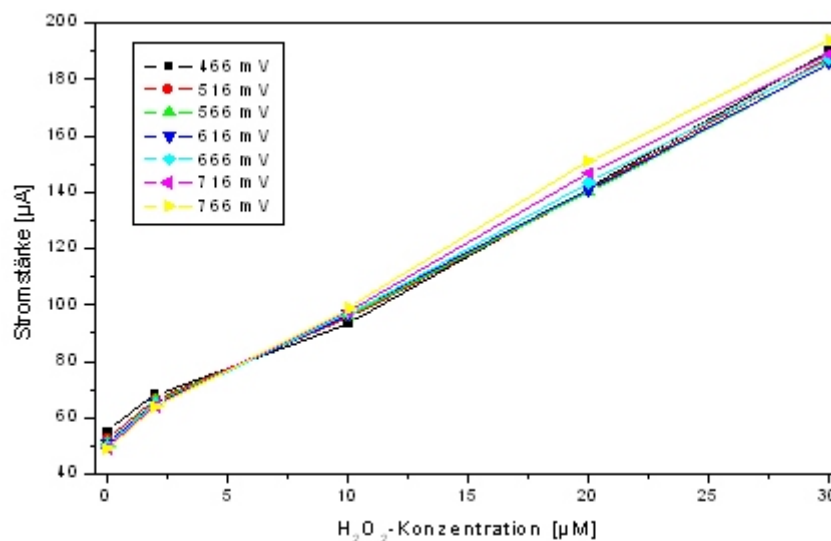


Abb. 4.51: Oxidationsstromstärken für H_2O_2 an Platin-Dickschicht-Elektroden bei ausgewählten Potentialen (im Plateaubereich) im zyklischen Voltammogramm

Die Reproduzierbarkeit der Messungen an sich wurde beispielhaft durch mehrere zyklische Voltammogramme mit komplettem Ein- und Ausbau einer Elektrode ermittelt. Die Standardabweichung der Stromstärken beim Scan in reinem Kaliumphosphatpuffer belief sich bei einem Potential von +716 mV auf 2,3 % ($n = 5$), die bei einer H_2O_2 -Konzentration von 20 µM auf 5,2 % ($n = 6$). Die quantitative Erfassung von H_2O_2 ist also auch mit zyklischer Voltametrie möglich, das Arbeitspotential für amperometrische Messungen beim Einsatz einer mit Enzymen beschichteten Elektrode sollte oberhalb von +450 mV vs. Ag/AgCl gewählt werden.

Bei amperometrischen Messungen im Becherglas mit mehreren unbehandelten Platin-Dickschicht-Elektroden wurde die Reproduzierbarkeit der Messung von H_2O_2 bei Verwendung mehrerer Sensoren bestimmt. In einer H_2O_2 -Lösung [20 mM] wurden bei der chronoamperometrischen Vermessung bei einem Potential von +716 mV vs. Ag/AgCl die resultierenden Stromstärken nach Einstellung eines konstanten Grundstroms ermittelt, was nach 25 Sekunden der Fall war. Es ergab sich eine Standardabweichung von 29 % bei Vermessung mehrerer Pt-Sensoren aus einem Herstellungsgang ($n = 7$). Die mehrmalige Messung mit einem bestimmten Pt-Sensor ergab eine Standardabweichung von nur 7,8 % ($n = 4$). Die wesentlich höhere Standardabweichung bei Vermessung mehrerer Sensoren hatte also seine Ursache hauptsächlich in der Reproduzierbarkeit der Elektrodenherstellung an sich - trotz einheitlicher Pt-Schichtdicken von 20 µm - und nicht im Meßverfahren.

4.2.1.2 Eignung von Edelstahlrohrstutzen als Einlaß in der wall-jet-Zelle als Gegenelektrode

Bei der Verwendung einer Gegenelektrode in einer Drei-Elektroden-Meßanordnung muß sichergestellt sein, daß deren Oberfläche in der Lösung ausreichend groß ist, um den auftretenden Stromfluß komplett abzuleiten und dadurch seine Erfassung durch den Potentiostaten zu gewährleisten. Andernfalls wäre eine teilweise Ableitung durch die Referenzelektrode die Folge, was die zu messenden Stromstärken reduzieren würde. Bei der später durchgeführten Bioprozessanalytik wurden die Flüssigkeiten durch HPLC-Edelstahlrohrstutzen im Bereich des Eingangsgewindes der wall-jet-Zelle geleitet, die als Gegenelektrode geschaltet wurde. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Stahlkapillaren, die in diese Zellen bis direkt vor die Elektrodenoberflächen eingeschoben worden waren, ergab sich dadurch eine geringere Oberfläche der Gegenelektrode in der Lösung sowie eine größere Entfernung zur Arbeitselektrode. Es wurden deshalb zum Vergleich im Becherglas zyklische Voltamogramme (von -1200 bis +1200 mV vs. Ag/AgCl, 100 mV/s, in KPi pH 7,5) aufgenommen, bei denen als Gegenelektrode zuerst ein blanker Edelstahlrohrstutzen mit großer Oberfläche, danach derselbe Stutzen eingefäßt in einem enganliegenden Überschlauch aus Silikon gebildet wurde. Dessen späterer Einbau in die wall-jet-Zelle wurde auf diese Weise simuliert, als Oberfläche stand so nur die Innenfläche zur Verfügung. Der Vergleich beider Voltamogramme zeigte keinen geringeren Stromfluß zum Nachteil des gekapselten Rohres. Der Einsatz des Stahlstutzens in der Detektorzelle als Gegenelektrode konnte somit erfolgen.

4.2.1.3 Vergleich der Arbeitsstabilität von GOD-Sensoren mit und ohne die stabilisierenden Additive BSA und Polylysin

Die Aktivität von immobilisierten Enzymen kann durch bestimmte Additive stabilisiert werden, insbesondere für die GOD waren bereits mehrere solcher Substanzen erfolgreich getestet worden. In bezug auf die Lagerstabilität von hier eingesetzten GOD-Sensoren hatte sich der kombinierte Zusatz von Rinderserum-Albumin (BSA) sowie Polylysin in der Paste als positiv gegenüber anderen Additiven gezeigt [130]. Die Sensoren waren dabei nach ihrer Herstellung in einer FIA-Apparatur auf ihre Anfangsaktivität getestet und nach einwöchiger Lagerung im Puffer erneut vermessen worden.

Um die Arbeitsstabilität von GOD-Sensoren mit und ohne diese Additive vergleichen zu können, wurden zwei Platin-Dickschicht-Sensoren im Doppellayout auf je einer halbkreisförmigen Elektrode mit Enzympaste ohne, auf der gegenüberliegenden mit den Additiven BSA und Polylysin bedruckt. Diese wurden in die Detektorzellen der FIA-Apparatur

eingesetzt, die auch zur Bioprozessanalytik tierischer Zellen herangezogen wurde. Im Dauertest mit der Vermessung von Glukoselösung [10 mM], wobei der Probendurchsatz in etwa dem unter den späteren Bedingungen beim Einsatz am Fermenter entsprach, ergab sich (für beide Vergleichssensoren) eine erhöhte Arbeitsstabilität der GOD-Membranen, welche die Additive BSA und Polylysin enthielten (Abb. 4.52).

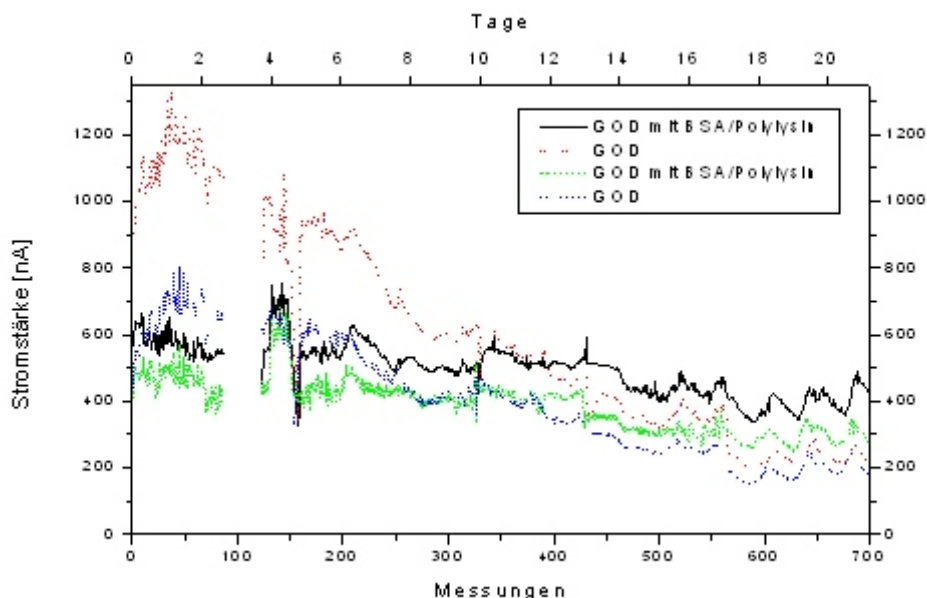


Abb. 4.52: Arbeitsstabilität von zwei Glukose-Dickschicht-Elektroden (Doppellayout), jeweils mit und ohne die Additivkombination BSA/Polylysin in der Bioprozess-FIA bei Injektion einer Glukose-Lösung [10 mM]

So betrug die Restaktivität der GOD-Membranen ohne Additive nach 700 Messungen in 15 Tagen noch 30 % bzw. 40 %, die der GOD-Membranen mit Additiven war dagegen nur auf 70 % bzw. 63 % reduziert. Die relativ hohe Ausgangsaktivität einer der Elektroden deutet auf Probleme bei der Reproduzierbarkeit beim Bedrucken mit Enzympaste hin. Zyklische Schwankungen in der Enzymaktivität (insbesondere zwischen den Messungen 500 bis 700) wurden durch unterschiedliche Temperaturen am Tag und in der Nacht verursacht. Kurzfristige Abweichungen waren offensichtlich gerätebedingt. Die stabilisierende Wirkung bezüglich der katalytischen Aktivität der GOD im Dauereinsatz durch kombinierte Zugabe von BSA und Polylysin in die hier verwendete Enzympaste wurde somit gezeigt.

4.2.1.4 Arbeitsstabilität eines GOD-Sensors mit Stabilisatoren

Mit einer GOD-Elektrode, die nach dem bisherigen Verfahren mit den stabilisierenden Additiven Polylysin und BSA hergestellt worden war, wurde in der TAS-FIA ($D = 52$; Abb. 3.6) die Arbeitsstabilität bei Mehrfachmessungen sowie Dauerbelastung untersucht.

Bei Mehrfachmessungen über drei Tage mit Glukoselösungen (2,5, 5, 10, 15 und 20 g/L in deionisiertem Wasser; in Serie einmal pro Stunde vermessen) ergab sich eine kontinuierliche, exponentielle Abnahme der resultierenden Stromstärken auf ca. 77 % des Ausgangswertes.

Anschließend wurde eine Glukoselösung (0,4 g/L in Clark & Lubs - Puffer) als Carrier verwendet und dauernd, also ohne Injektion anderer Lösungen, durch die Detektorzelle gepumpt. Das resultierende Dauersignal entsprach in seiner Stromstärke aufgrund der Dispersionsverhältnisse ziemlich genau dem Peak, der bei den vorhergehenden Meßzyklen bei Injektion einer 20 g/L - Lösung erreicht wurde. Gemessen wurde auf diese Weise über einen Zeitraum von 21 h, was einer Belastung der aufgedruckten Enzymmembran mit (enzymatisch aus Glukose) erzeugtem H_2O_2 von annähernd 1000 Messungen mit Injektion der 20 g/L Glukoselösung (wie oben) entsprach. Das Dauersignal wurde dabei in seiner Höhe als H_2O_2 -Belastung der immobilisierten Enzyme aufgefaßt und die sich ergebende Fläche unter der Signallinie als Integral dieser Belastung angesehen, welches in etwa den addierten Peakflächen von 1000 Einzelsignalen entsprach. Das Signal sank dabei in der ersten Stunde relativ stark um ca. 22 %, um in der Folgezeit nur noch geringfügig abzufallen (Restaktivität nach 21 h: 73 %). Die verwendete Glukoseelektrode zeigte also eine hohe Arbeitsstabilität. Gerade bei Dauerbelastung mit Glukose bzw. dem resultierendem Wasserstoffperoxid war die Aktivitätsabnahme - nach der ersten Stunde mit relativ starkem Verlust - mit 5 % der Ausgangsaktivität in den folgenden 20 Stunden sehr gering.

Zur Untersuchung der Wirkung von Kulturüberständen aus der Fermentation tierischer Zellen wurde diese GOD-Elektrode im FIA-System der mehrfachen Injektion eines Mediumüberstandes (ZKT1-Medium, 5 % FCS, aus K4E7-Maus-Hybridomzelllinie) ausgesetzt. Injiziert wurden im Wechsel je einmal die Glukoselösung [20 g/L] und folgend fünfmal das Medium mit derselben Frequenz wie obige Glukoseserien. Das durch das Medium verursachte Signal war mit 7 % des Wertes für die Glukoselösung erwartungsgemäß relativ niedrig. Nach 14 Meßzyklen war keine Abnahme der Signalhöhe festzustellen, was die Unempfindlichkeit der Enzymmembran gegenüber diesem Medium zeigt. Weder wurde die enzymatische Aktivität beeinträchtigt noch machte sich ein eventuelles Verblocken der Membran durch Mediumbestandteile bemerkbar.

4.2.1.5 Lagerstabilität trocken gelagerter GOD-Sensoren mit Stabilisatoren

Die Lagerstabilität einer GOD-Elektrode (mit den Stabilisatoren Polylysin und BSA) wurde ermittelt, indem im FIA-System (nach Abb. 3.6) eine Glukoselösung [20 g/L] nach Injektion vermessen wurde. Anschließend wurde dieser Sensor ausgebaut und für 24 h trocken im Kühlschrank aufbewahrt. Die neuerliche Vermessung derselben Glukoselösung erbrachte noch eine Signalhöhe von 86%.

Eine weitere Untersuchung einer anderen GOD-Elektrode erbrachte ein ähnliches Ergebnis. Die Vermessung einer Glukoselösung [2 g/L] im FIA-System (nach Abb. 3.3) erbrachte nach Trocknung und Lagerung bei 4°C oder auch nach erneuter Bestrahlung im UV-Belichter keinen Hinweis auf eine signifikante Abnahme der enzymatischen Aktivität (Abb. 4.53).

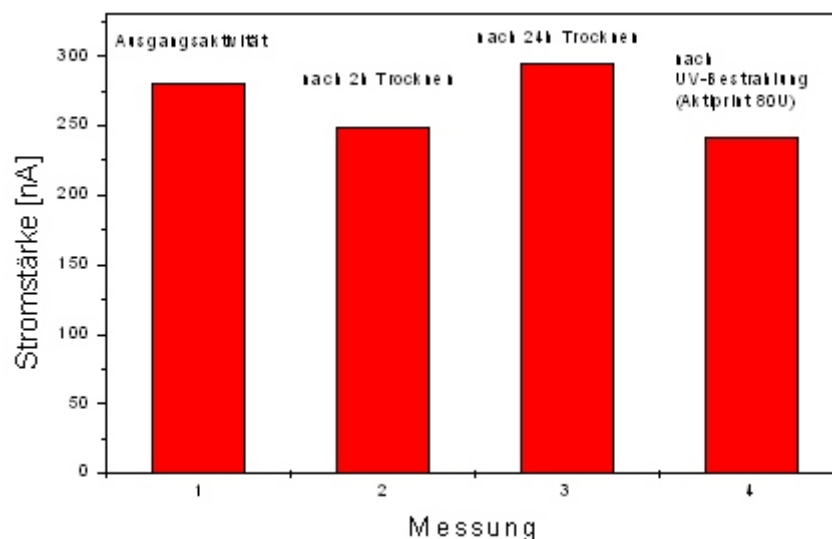


Abb. 4.53: Lagerstabilität einer GOD-Elektrode nach Benutzung

Die hier eingesetzten GOD-Elektroden können also nicht nur direkt nach ihrer Herstellung, sondern auch nach Gebrauch prinzipiell auch trocken gelagert werden. Eine Ablösung der Paste beim Trockenvorgang nach Benutzung wurde bei diesen beiden Sensoren hier nicht beobachtet.

4.2.2 Bioprozessmonitoring bei Kultivierungen von *Aspergillus niger*

Die TAS-FIA-Apparatur wurde zum on-line Glukosemonitoring während zweier Fed-Batch Fermentationen von *Aspergillus niger* (mit S65TGFP-Gen) in zwei verschiedenen Aufbauten eingesetzt. Ziel der von M. Ganzlin durchgeführten Kultivierungen war zum einen die

Beobachtung der Stoffwechselaktivitäten des kultivierten Stammes bei Wechsel der Kohlenstoffquelle von Xylose zu Maltose, zum anderen der Vergleich mit der sich ergebenden Morphologie und Pelletgröße sowie -struktur [95]. Die Gabe von Maltose induzierte bei diesem Organismus die Produktion von Enzymen, die das Disaccharid Maltose in seine Monomere Glukose und Fruktose spalteten und folgend Glukose in den Stoffwechsel einbanden. Bei beiden Fermentationen wurde modifiziertes, vollsynthetisches Vogel-Medium ohne Vitaminzusatz verwendet. Der pH-Wert bewegte sich um 5,5, die Temperatur betrug konstant 25°C. Nach Inokulation aus Vorkulturen betrug zum Zeitpunkt $t = 0$ die Sporendichte 10^6 Sporen mL^{-1} .

Bei der ersten Kultivierung (Abschnitt 4.2.2.1) erfolgte die Induktion durch einen Maltosepuls von $5,0 \text{ g L}^{-1}$ und einer nachfolgenden, linear ansteigenden Zufütterungsrate von $0,091 \text{ g min}^{-1} \text{ h}^{-1}$; bei der zweiten Kultivierung (Abschnitt 4.2.2.4) erfolgte die Induktion durch einen Maltosepuls von $5,0 \text{ g L}^{-1}$ und einer nachfolgenden, linear ansteigenden Zufütterungsrate von $0,031 \text{ g min}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Das anfängliche Volumen der ersten Kultivierung betrug 25 Liter, das der zweiten 8 Liter.

4.2.2.1 Bioprozessmonitoring mit niedriger Dispersion im FIA-System

Bei der ersten Kultivierung von *Aspergillus niger* wurde die on-line Messung von Glukose in einem FIA-Aufbau mit niedrigem Dispersionskoeffizienten durchgeführt. Da das verwendete Vogel-Medium einen für die Fermentation von Pilzen typischen leicht aziden pH-Wert von 5,5 aufwies, musste dieser im FIA-System ausgeglichen werden, um die immobilisierten Enzyme auf der Dickschicht-Elektrode zu schützen bzw. eine gleichbleibende Aktivität während der Messungen zu gewährleisten. Die durchgeführte Titration ergab, daß unter Verwendung von 0,5 M Clark & Lubs Puffer pH 8,0 als Carrierlösung bei den im System vorliegenden Dispersionsverhältnissen (nun $D = 5,4$) der pH-Wert an der Stelle der Elektrode nicht unter 7,9 fiel. Dies sollte eine gleichbleibende katalytische Aktivität der immobilisierten Glukoseoxidase sicherstellen. Zur Angleichung an die Eigenschaften der Fermenterprobe in bezug auf Zusammensetzung (Osmolarität u.ä.) wurden die Kalibrierlösungen ebenfalls in Vogel-Medium angesetzt. Obwohl die erhaltenen Stromstärken bei den höheren Konzentrationen schon den Beginn des Sättigungsbereiches anzeigten (Abb. 4.54), war eine Kalibrierung nach Abzug des Kontrollwertes dennoch möglich ($r = 0,9933$).

Die erhaltenen Stromstärken für die Kontrollelektrode zur Aufnahme der Blindwerte stiegen linear mit dem Glukosegehalt an und sind offensichtlich durch den sogenannten cross-talk-Effekt begründet: ein Teil des in der GOD-Membran entstandenen H_2O_2 gelangte durch Konvektion und Diffusion zur Kontrollelektrode und reagierte dort ab. Das bei der Differenzbildung von dem Signal der Enzymseite zu subtrahierende Signal der

Kontrollelektrode wird bei der Messung jedoch immer im gleichen Verhältnis zu unterschiedlichen Glukosegehalten stehen, weshalb dieser Effekt keinen Einfluß auf die Ermittlung des Glukosegehaltes hat. Sowohl Carrier- als auch Probenpumpe wurden mit einer Fließrate von 0,8 mL/min betrieben. Die Kalibrierlösungen (0,5, 1, 2, 4 und 8 g/L) sowie die Fermenterprobe wurden fortlaufend je einmal in Serie vermessen, was eine zeitliche Dauer von 45 Minuten pro Meßzyklus ergab.

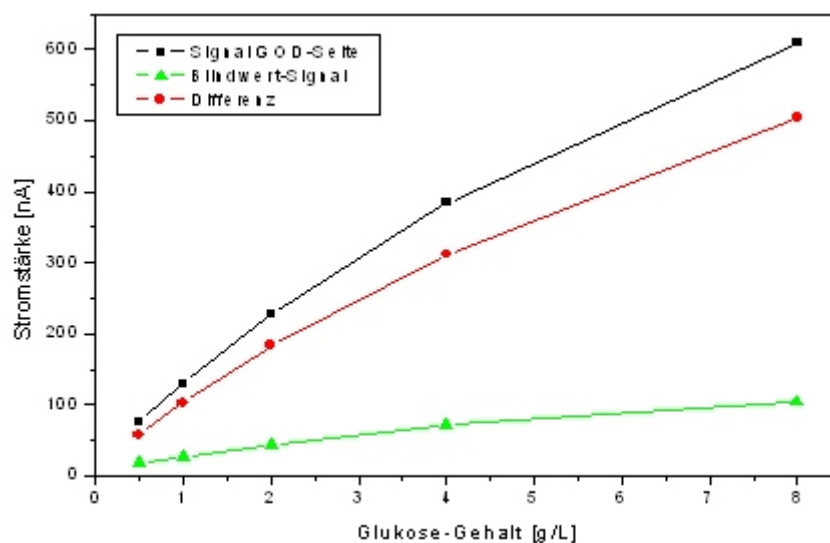


Abb. 4.54: Beispiel für eine Kalibration (nach Fermentationsdauer 62 h, $r = 0,9933$)

Im Fermenter trat Glukose durch die Maltose-Induktion nach einer Kultivierungsdauer von 85 h auf, was sowohl on-line vom FIA-System wie auch off-line mit dem Referenzgerät (Yellow-Springs-Analysator) nachgewiesen wurde (Abb. 4.55).

Die mit dem FIA-System ermittelten Werte waren jedoch erheblich höher als die durch das Referenzgerät angezeigten. Von M. Ganzlin durchgeführte Spike- bzw. Verdünnungsversuche bestätigten die Resultate des Yellow-Springs-Gerätes, so daß man von einer Beeinflussung der Signale der FIA-Enzymelektrode durch unbekannte Störsubstanzen ausgehen muß, die vermutlich durch den veränderten Metabolismus der Aspergillen infolge der Maltosezufütterung auftraten. Die Signalstärken der Kontrollelektrodenseite für die Fermenterprobe stiegen ab diesem Zeitpunkt auch stark an (Abb. 4.56). Unterstellt man eine erhöhte Durchlässigkeit der GOD-Enzymmembran für diese Substanzen, wäre tatsächlich nach Abzug des Kontrollwertes die Ermittlung eines zu hohen Glukosewertes die Folge. Bei dem Referenzgerät ist der Einfluß von Störsubstanzen aufgrund der - der Enzymmembran nachgeschalteten - zusätzlichen Membran direkt vor der Platin-Elektrode - bedingt durch ihre geringe Porengröße und dadurch

resultierenden niedrigen Permeabilität für solche Stoffe - ausgeschlossen bzw. stark minimiert. Die weitere Möglichkeit, daß in der Fermenterprobe ab diesem Zeitpunkt zusätzliche Substanzen auftraten, die die immobilisierte GOD zum Zeitpunkt der Probenmessung reversibel aktivierten, erscheint ausgeschlossen, da ebenso das Signal des Referenzgerätes hätte beeinflußt werden müssen.

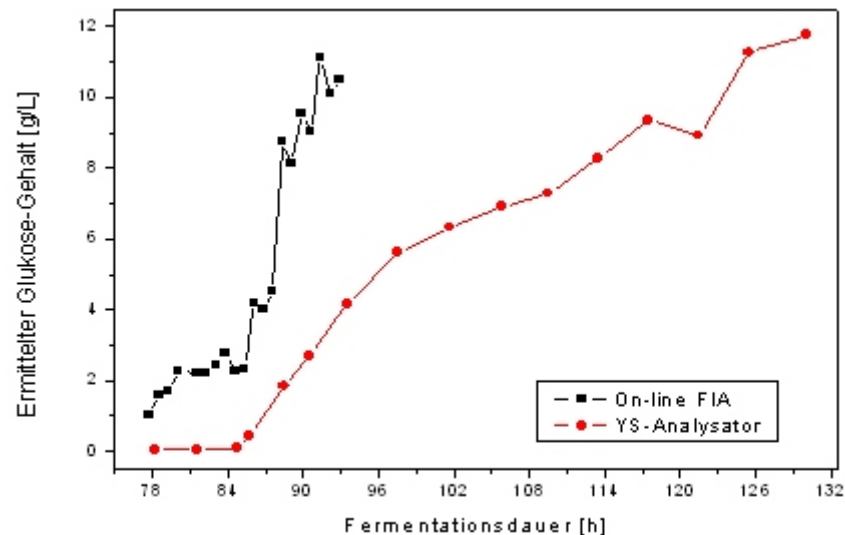


Abb. 4.55: Vergleich der ermittelten Glukose-Gehalte der on-line FIA mit den off-line Werten des YS-Analysators

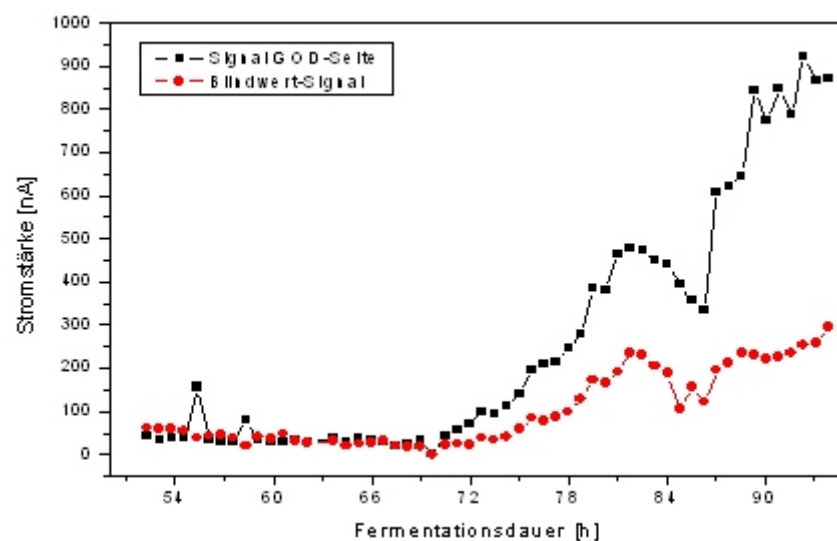


Abb. 4.56: Vergleich der durch die Realproben on-line erhaltenen Signale der GOD-Seite mit denen der Blindwertseite während der Aspergillus-Fermentation

Die Arbeitsstabilität der Elektrode als wichtige Voraussetzung für ausreichend hohe, auswertbare Signale war während der Messungen gegeben, wie die erhaltenen Stromstärken für die Kalibrierlösungen zeigen (Abb. 4.57). Einige seltene Fehlschaltungen des Selektionsventils erbrachten Werte, die deutlich von der zu erwartenden Höhe abwichen, eine Betriebsstörung dieses Ventils erzwang schließlich die Unterbrechung der FIA-Messungen nach 94 Stunden.

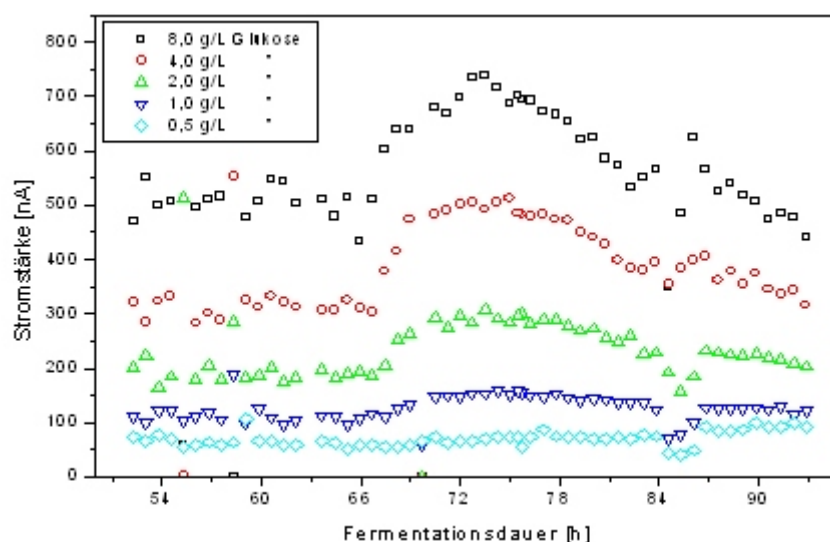


Abb. 4.57: Arbeitsstabilität des GOD-Sensors während der *Aspergillus*-Fermentation

Bei späteren Untersuchungen mit der FIA an den off-line analysierten Proben konnten diese Überbestimmungen nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelte es sich um eine labile Substanz, die bereits während der Lagerung zwischen Probenahme und Messung abreagierte und dann einer Bestimmung nicht mehr zugänglich war.

4.2.2.2 Charakterisierung der FIA-Apparatur

Die Abweichungen der FIA-Glukosemessungen zur Referenzanalytik bei der ersten *Aspergillus*-Fermentation waren offensichtlich durch das Auftreten von interferierenden Störsubstanzen verursacht worden, die in unterschiedlichem Maße durch die GOD- bzw. BSA-Kontrollmembran zu den Elektrodenflächen gelangten. Zur Minimierung bzw. Unterdrückung dieses Effektes wurden mehrere GOD-Elektroden modifiziert hergestellt. Des weiteren wurde mit Einbauten in den Fließweg (Kartuschen bzw. eine Schlauchwendel) und einer kleinvolumigen Injektionsschleife die Dispersion stark erhöht, wodurch eine entsprechende Verdünnung der Probe in der Detektorzelle und somit eine Vergrößerung des linearen

Konzentrationsbereiches mit sehr guten Korrelationskoeffizienten resultierte (Abb. 4.58; Tabelle 4.3).

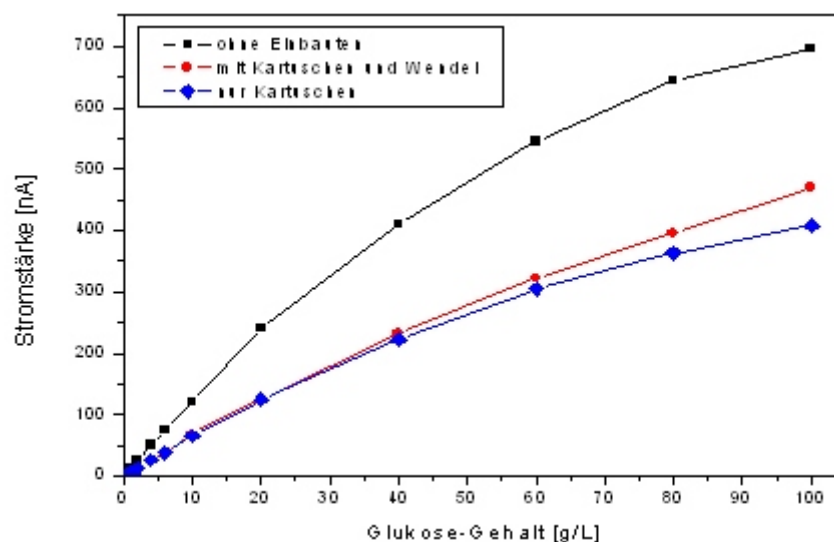


Abb. 4.58: Kennlinien für unterschiedliche Einbauten in der FIA-Apparatur zur Beeinflussung der Dispersion (Resultate mit doppelt gecoverter GOD-Elektrode (s.u.))

Die relevanten Daten der Kalibrationen der FIA-Apparatur mit den unterschiedlichen Einbauten zwischen Injektionsventil und Detektorzelle zur Beeinflussung der Dispersion sind in Tabelle 4.3 zusammengefaßt.

Einbauten	Dispersionskoeffizient D	Linearer Bereich	Korrelationskoeffizient r
-	16	0,1 - 20 g/L	1,0000
Kartusche	26	-	-
2 Kartuschen	39	0,1 - 40 g/L	0,9979
2 Kartuschen / Wendel	52	0,1 - 40 g/L	0,9987

Tabelle 4.3: Charakterisierung der FIA-Apparatur mit verschiedenen Einbauten für eine doppelt gecoverte GOD-Elektrode

Das Injektionsvolumen betrug 6,6 μL , die Fließrate des Carrierstroms 2 mL/min. Eingesetzt wurde zur Untersuchung von modifizierten GOD-Elektroden (s.u.) sowie zur Prozessanalytik der *Aspergillus*-Kultivierungen der Aufbau mit der höchsten Dispersion. Bei diesem zeigten sich bei der Vermessung von Glukoselösungen kein Unterschied in der Signalhöhe, gleichgültig, ob die Glukose in Clark & Lubs - Puffer, deionisiertem Wasser oder Vogel-Medium aus den *Aspergillus*-Fermentationen gelöst worden war.

4.2.2.3 Modifikation des GOD-Sensors

Die Signale bei Injektion von Lösungen, die die bekannte (Modell-)Störsubstanz Ascorbinsäure (10 g/L in deionisiertem Wasser) enthielten, ergaben eine stark erhöhte Permeabilität dieses Stoffes für die Enzymmembran gegenüber der Kontrollelektrode (Signalhöhe >1800 nA gegenüber ca. 20 nA). Begründet ist dies vermutlich im Zusatz von Polylysin als stabilisierendem Additiv auf der Enzymseite. Die positivierten Seitenketten des Polylysins sind sicherlich einem erhöhten Transport von negativ geladenen interferierenden Substanzen wie Ascorbinsäure durch die GOD-Membran dienlich, was bei der Vermessung von Realproben bei Kalibration mit Standardlösungen zur Ermittlung einer zu hohen Glukosekonzentration führen kann, wie es bei der ersten *Aspergillus*-Kultivierung der Fall war. Ebenfalls möglich ist eine unterschiedliche Polymerisation der beiden Schichten während der Belichtung, die zu verschiedenen Permeabilitäten geführt haben könnte.

Da bei der Fermentation von Aspergillen Störsubstanzen auf der Enzymseite ein relativ hohes Signal erbrachten, wären künftige Abweichungen bei der Ermittlung des Glukosewertes nur dann vermeidbar, wenn die Kontrollelektrodenmembran ebenso beschaffen wäre, bei der dann ebenso durch interferierende Substanzen hohe Signale registriert würden. Unabdingbar wären exakt gleich dicke Pastenschichten mit denselben Eigenschaften hinsichtlich der Permeabilitäten bei Verwendung von GOD und BSA, geringe Differenzen in der Dicke der Schichten hätten eine relativ große Auswirkung auf die Höhe des von der Enzymelektrode erfaßten Meßsignals abzuziehenden Wertes. Vielversprechender als die Verwendung von Polylysin auch in der Kontrollelektrodenmembran erschien daher, die Durchlässigkeit für Störsubstanzen zu minimieren, da auf Polylysin als wirksam stabilisierendes Additiv in der GOD-Membran nicht verzichtet werden sollte.

Der Ansatz, zunächst beide Platin-Elektrodenflächen mit den konventionellen, für Ascorbinsäure relativ schwer passierbaren (BSA-)Kontrollmembranen zu bedrucken und nach deren Fixierung dann die GOD- bzw. BSA-Schicht aufzubringen, führte zu stark schwankenden Grundlinien einerseits und zu äußerst niedrigen Stromstärken für die Glukosestandards andererseits (nicht gezeigt). Ausschlaggebend war augenscheinlich, daß die zuerst aufgedruckten

Schichten aufgrund der Rauigkeit der Platinpastenoberflächen effektiv dicker waren als die anschließend auf die glatten ausgehärteten UV-Pastenmembranen aufgebracht. Dadurch befand sich relativ wenig Enzym in der (zusätzlich) aufgetragenen GOD-Schicht, was zwangsläufig den Glukoseumsatz reduzieren mußte; außerdem war der Transport des entstandenen Wasserstoffperoxids hin zur Platinoberfläche erschwert. Die Verwendung einer so bedruckten Elektrode war aus diesen Gründen nicht möglich.

Um die Ascorbinsäure dennoch wirksam zurückzuhalten, wurde deshalb bei einer weiteren Elektrode die (nun als erste Schicht) aufgetragene GOD-Membran nacheinander mit zwei UV-Pastenschichten (mit BSA) versehen. Der Vergleich der erhaltenen Stromstärken für die GOD-Seite des Dickschicht-Sensors bei Injektion des 20 g/L Glukosestandards sowie der 10 g/L Ascorbinsäurelösung zeigt, daß beide Signale aufgrund des erhöhten Diffusionswiderstandes erwartungsgemäß geringer wurden (Abb. 4.59).

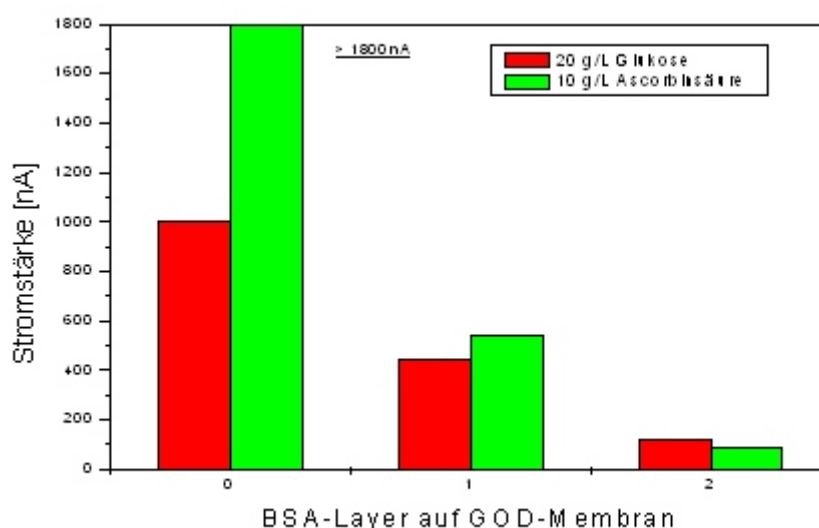


Abb. 4.59: Vergleich der Signale für Glukose (20 g/L) und Ascorbinsäure (10 g/L) bei zusätzlichen (BSA-)Pastenschichten

Das Signal der Störsubstanz Ascorbinsäure nahm nach dem Auftragen der zusätzlichen Schichten jedoch weitaus stärker ab als das enzymspezifische Signal. So war das Ascorbinsäuresignal zunächst an der GOD-Seite sehr viel höher als der Meßbereich des Potentiostaten (1800 nA), an der Kontrollseite resultierte dagegen eine Stromstärke von nur etwa 20 nA (nicht gezeigt). Nach dem Auftragen zweier zusätzlicher Schichten auf die Enzymseite war das Signal auf etwa 90 nA reduziert worden und damit größenordnungsmäßig im Bereich des Kontrollsignals. Das enzymspezifische Glukosesignal war nicht im gleichen Maße

gesunken, es verblieb eine Stromstärke von 120 nA gegenüber 1000 nA vor dem Auftrag zusätzlicher Schichten.

Da eine weitere Reduktion des enzyme-spezifischen Signals nicht erfolgen durfte und das Störsignal deutlich reduziert worden war, wurde dieser Sensor zum on-line Monitoring der zweiten Kultivierung von *Aspergillus niger* eingesetzt.

4.2.2.4 Bioprozessmonitoring mit hoher Dispersion und modifiziertem GOD-Sensor im FIA-System

Um die bei der ersten Kultivierung von *Aspergillus niger* aufgetretenen Abweichungen des Glukosewertes zur Referenzanalytik zu vermeiden, wurde zum Monitoring der zweiten Kultivierung zum einen die Dispersion im FIA-System stark erhöht und zum anderen eine modifizierte GOD-Elektrode eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2.3). Als Carrierpuffer wurde nun 0,1 M Clark & Lubs - Puffer pH 8,0 eingesetzt, der aufgrund der hohen Verdünnung des Probensegments im Schlauchsystem ausreichte, um den pH-Wert 8,0 in der wall-jet-Zelle aufrechtzuerhalten. Die Fließrate des Carriers betrug hier 2,0 mL/min, die der Probenpumpe anfänglich 0,8 mL/min. Ein Meßzyklus beanspruchte exakt 60 Minuten, die Kalibrierlösungen (siehe 3.7.5) sowie die Fermenterprobe wurden dabei je einmal vermessen.

Die Kalibrierungen mit den bei dieser Kultivierung verwendeten Standardlösungen hatte für das eingesetzte FIA-System mit verschiedenen Einbauten und damit unterschiedlichen Dispersionskoeffizienten sehr gute Korrelationen für die jeweiligen linearen Bereiche ergeben (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Für das Prozessmonitoring wurde der Aufbau mit der höchsten Dispersion gewählt, um über den gesamten erwarteten Glukose-Konzentrationsbereich eine gleichbleibend gute Linearität zu gewährleisten.

Der Vergleich der sich ergebenden on-line Glukosewerte der FIA-Apparatur mit den off-line Resultaten des Referenzgerätes erbrachte bis zum Auftreten von Glukose im Fermenter ab etwa 78 h Kultivierungsdauer beinahe deckungsgleiche Werte (Abb. 4.60). Mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa fünf Stunden relativ zur off-line Analytik lieferte die FIA-Apparatur im Zeitraum von 78 h - 90 h weiterhin übereinstimmende Glukosekonzentrationen. Diese zeitliche Verzögerung wurde verursacht durch die äußerst hohe Umlaufgeschwindigkeit des Propellerrührers im Fermenter, was einen starken Gaseintrag ins Medium mit Schaumbildung bewirkte. Die Folge war eine ständige Verdrängung der Fermenterflüssigkeit in der Probenahmesonde, weshalb die Probenpumpe nur geringe Mengen Fermenterprobe und ungleich mehr Gas ansaugte. Das angesogene Gas wurde durch die eingebaute Luftblasenfalle entfernt, die Flüssigkeitssegmente angestaut und zeitverzögert vermessen.

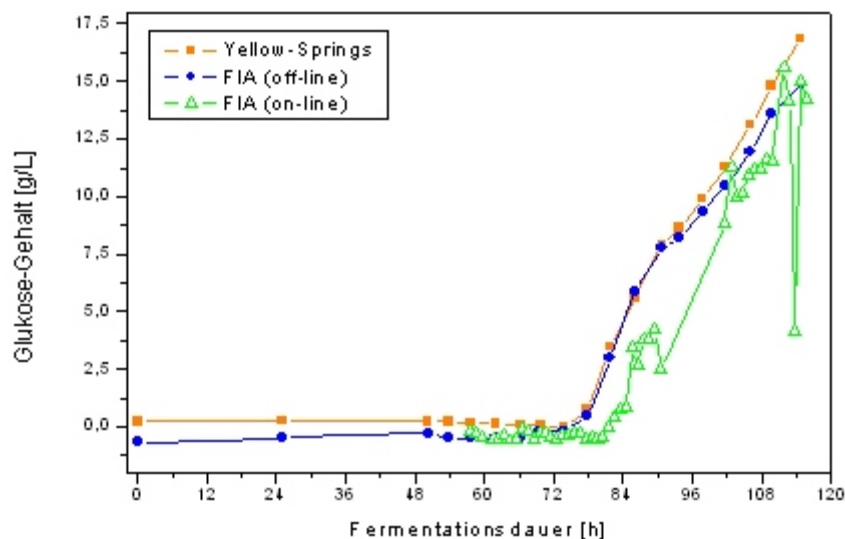


Abb. 4.60: Vergleich der on-line bzw. off-line Glukosewerte der FIA-Apparatur mit den off-line Werten des Yellow-Springs-Analysators

Um die zeitliche Verschiebung zu unterdrücken, wurde ab der Fermentationsdauer von 101 h die Fließrate der Probenpumpe auf 2,0 mL/min erhöht. Dadurch konnte die Zeitverzögerung auf ungefähr drei Stunden minimiert, jedoch nicht gänzlich unterdrückt werden. Die nachträgliche Vermessung der off-line Proben mit der FIA-Apparatur erbrachte jedoch tatsächlich eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzanalytik (Abb. 4.60), was belegte, daß die Abweichungen beim on-line Monitoring durch den Gaseintrag in die Probennahmesonde begründet waren.

Die Arbeitsstabilität des Sensors war über einen Zeitraum von 58 Stunden Dauerbetrieb gegeben, die erzielten Stromstärken für die Kalibrierlösungen blieben in diesem Zeitraum auf dem gleichen Niveau (Abb. 4.61). Die Schwankungen im 24-stündigen Intervall wurden durch die unterschiedlichen Temperaturen am Tag und in der Nacht im Technikum hervorgerufen. In bezug auf die Ermittlung des Glukosewertes im Fermenter wurde die Analytik jedoch nicht beeinträchtigt, da sich die Signalhöhen von einem zum nächsten Meßzyklus nicht gravierend unterschieden und deshalb die Kalibrationen für die jeweiligen Proben gültig waren. Der Korrelationskoeffizient war über die gesamte Fermentationsdauer in der Regel größer als 0,999. Die von den gemessenen Stromstärken der Enzymseite abgezogenen Blindwerte waren gering, betrugen stets weniger als 6 % des spezifischen Signals und veränderten sich in ihrer Höhe während der Fermentation nicht.

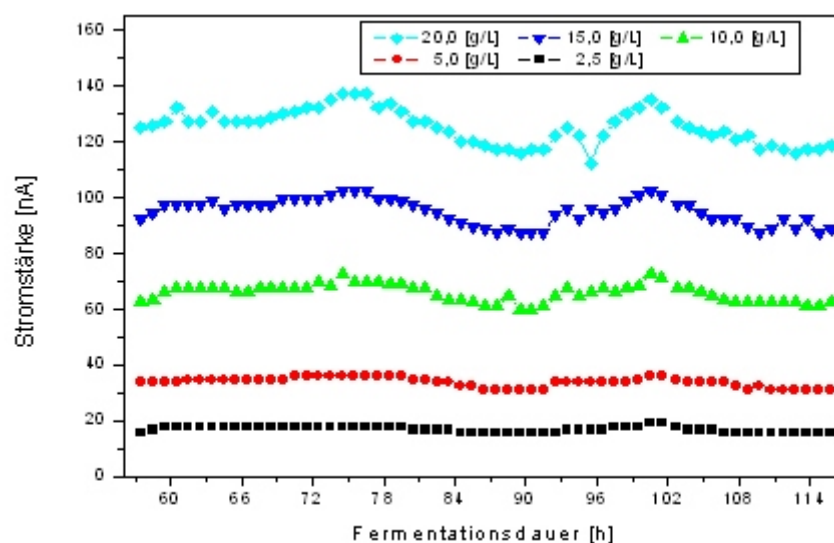


Abb. 4.61: Erzielte Stromstärken für die Kalibrierlösungen während der *Aspergillus*-Kultivierung (58 h - 116 h)

Der gecoverte, hier eingesetzte GOD-Sensor war bereits einige Wochen zuvor zum on-line Monitoring einer *Aspergillus*-Fermentation verwendet worden (gleicher FIA-Aufbau). Die dabei erzielten Stromstärken für die Kalibrationslösungen unterschieden sich in ihrer Höhe nicht von den bei dieser Fermentation erhaltenen, auch war keine Abnahme der Signalhöhen zu verzeichnen gewesen. Dies zeigte eine hohe Arbeitsstabilität in Kombination mit einer sehr guten Lagerstabilität (Daten enthalten in Abschnitt 4.2.2.5).

4.2.2.5 Langzeitstabilität des modifizierten GOD-Sensors

Der mit zwei Kontrollmembranen bedruckte GOD-Sensor zeigte beim Monitoring zweier *Aspergillus*-Kultivierungen eine sehr gute Arbeitsstabilität, über einen Zeitraum von vier bzw. zweieinhalb Tagen hatte die Aktivität der Enzymmembran nicht abgenommen (siehe Abschnitt 4.2.2.4). Überdies konnte mit diesem Sensor über zehn Wochen eine bemerkenswerte Lagerstabilität zwischen den Nutzungszeiträumen belegt werden, wie die Kalibrationen in Abbildung 4.62 für diesen Zeitraum verdeutlichen. Eine merkliche Abnahme der Signale ist nicht ersichtlich, die leicht unterschiedlichen Empfindlichkeiten wurden offensichtlich durch jeweils verschiedene Temperaturen zum Zeitpunkt der Meßwertaufnahme verursacht.

Eine „Überladung“ der Elektrode mit Enzym war nicht der Fall, dies wurde mit einer FIA-Apparatur erprobt. Wäre sehr viel GOD immobilisiert worden, wäre die Folge eine

Abhängigkeit des Signals von der Diffusion der Glukose in die Enzymmembran gewesen und nicht eine Abhängigkeit von der Enzymmenge. Die Kalibration mit verschiedenen Standardlösungen hätte zwar auch eine Linearität ergeben, doch könnte die wahre Stabilität der Enzyme nicht ermittelt werden. Bei einer „Überladung“ mit Protein würde der Ausfall einiger Enzyme in der Membran (zunächst) keinen Effekt auf das Signal haben. Erst ab dem Verlust eines größeren Anteils der katalytischen Aktivität würde die Signalhöhe abnehmen, da erst dann die Enzymmenge in der Membran die Signalhöhe limitiert. Bis zu diesem Zeitpunkt jedoch wäre die Diffusion des Substrates Glukose limitierend und eine absolute Stabilität der Enzymelektrode vorgetäuscht. Aus diesem Grund wurden Sensoren auch mit noch höheren Enzymgehalten (bis 10fach) beschichtet. Bei diesen Elektroden resultierten auch zunehmend höhere Signale (nicht gezeigt), was demonstrierte, daß der zum Monitoring eingesetzte Sensor nicht mit GOD „überladen“ war.

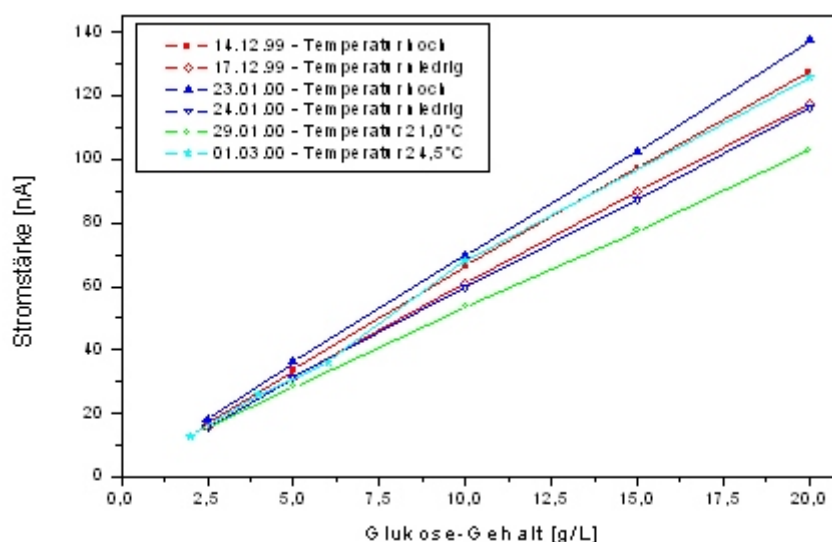


Abb. 4.62: Kalibrationen des doppelt gecoverten GOD-Sensors über mehrere Monate zur Ermittlung der Langzeitstabilität (Temperatur niedrig: ca. 22°C; Temperatur hoch: ca. 28°C)

4.2.2.6 Off-line Bestimmung von Fermenterproben aus Hefen-Kultivierung

Die Glukosebestimmung mit dem gecoverten GOD-Sensor in Proben aus einer Fed-Batch-Kultivierung der Hefe *Pichia farinosa* (Stamm ATCC 20210) ergab Werte, die im Vergleich zur Referenzanalytik (Yellow-Springs-Analysator) durchgängig etwa um 10 % geringer ausfielen (Abb. 4.63).

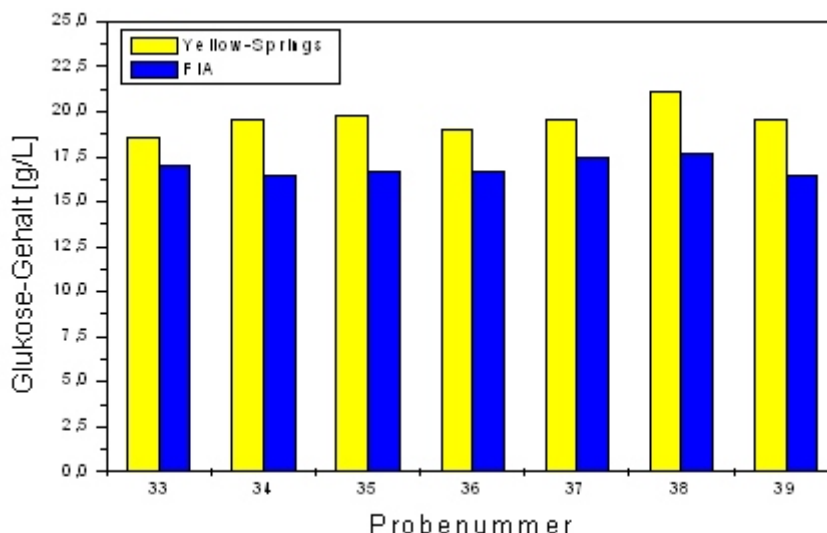


Abb. 4.63: Vergleich der ermittelten Glukosewerte von Fermentationsproben von *Pichia farinosa* der FIA-Apparatur mit denen des Yellow-Springs-Analysators

Alle Proben stammten aus unterschiedlichen Kultivierungszeiten, jedoch in allen Fällen aus der stationären Wachstumsphase dieser Hefen (33: 2,75 h; 34: 4,18 h; 35: 5,25 h; 36: 7,25 h; 37: 11,42 h; 38: 24,33; 39: 29,5 h). Der Biomassegehalt hatte sich in diesem Zeitraum von 3,63 g BTM/L auf 3,28 g BTM/L nur leicht verändert. Der pH-Wert der Proben hatte bei 8,2 gelegen, die Kalibration der FIA-Apparatur mit den Standards 5, 10, 20, 30 und 40 g/L Glukose (in deionisiertem Wasser) hatte einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,9998$ ergeben. Jede Probe konnte aufgrund der geringen Mengen nur einmal in der FIA-Apparatur vermessen werden.

4.2.2.7 Matrixeffekte beim Yellow-Springs-Analysator

Die Überprüfung des als Referenzgerätes eingesetzten Yellow-Springs-Analysators auf Matrixeffekte ergab ein bemerkenswertes Resultat. Dieses Gerät beruht ebenfalls auf der selektiven Katalyse der Oxidation der Substrate Glukose bzw. Laktat durch die entsprechenden Oxidasen, die in zwei austauschbaren Membranen immobilisiert sind. Das jeweilige Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid wird elektrochemisch an polarisierten Platinelektroden umgesetzt, die mit einer kleinporigen Polymermembran beschichtet sind. Die Elektroden sowie Membranen sind in einer mit einem Rührer versehenen Mischkammer lokalisiert, die ein definiertes Volumen des Meßpuffers enthält. Im eingeschalteten Zustand führt der Analysator regelmäßige Autokalibrationen durch, indem eine bestimmte Menge Kalibrationspuffer (Lösung des Herstellers) in die Mischkammer injiziert wird (Einpunktkalibration). Bei Verwendung der

Standardeinstellungen ist der lineare Meßbereich von 0,1 g/L bis 25 g/L Glukose gegeben. Es wurden Glukose- sowie Laktatbestimmungen in deionisiertem Wasser, Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) sowie Clark & Lubs - Puffer (pH 8,0) angesetzten Lösungen mit Einwaagen von je 0,5, 1,0 und 2,0 g/L durchgeführt. Ziel war die Überprüfung des Analysators auf sein Ansprechverhalten bei verschiedenen Lösungszusammensetzungen sowie die Messung von bei der Bioprozessanalytik verwendeten Kalibrierlösungen hinsichtlich Lagerstabilität, wobei hier auf die Zugabe von Natriumazid verzichtet wurde. Die gezeigten Ergebnisse beruhen auf Einfachbestimmungen, da bei Wiederholungsmessungen meist das exakt gleiche Resultat erzielt wurde, Reproduzierbarkeit an sich also gegeben war. Die Resultate für zwei Stunden alte Lösungen (Einwaage 2,0 g/L) sind aufschlußreich (Abb. 4.64). Die Messungen mit dem YS-Gerät unterlagen ganz offensichtlich einem Matrixeffekt, denn alle ermittelten Werte wichen von der Einwaage ab.

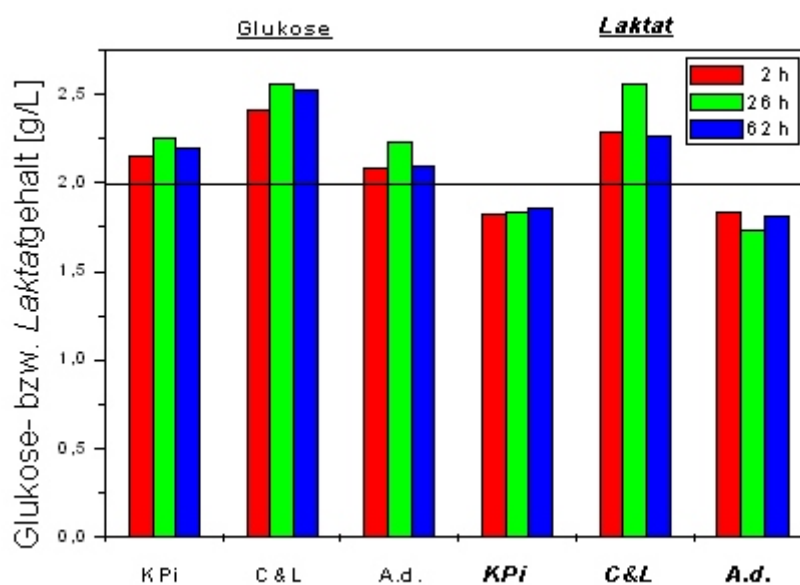


Abb. 4.64: Vergleich der mit dem Yellow-Springs-Analysator ermittelten Glukose- und Laktatwerte bei verschiedenen Puffersystemen nach unterschiedlichen Zeiten (Einwaage je 2,0 g/L, durch die Linie dargestellt; Laktatwerte sind kursiv beschriftet)

Für Glukose ergab sich bei allen drei Lösungen eine Überbestimmung, die beim Clark & Lubs - Puffer am höchsten ausfiel (2,56 g/L). Für Laktat ergaben sich sowohl Über- als auch Unterbestimmungen, wobei auch hier für den Clark & Lubs - Puffer der höchste Gehalt ermittelt wurde (2,29 g/L). Die jeweiligen Werte für deionisiertes Wasser sowie Kaliumphosphatpuffer

waren dagegen annähernd gleich. Die Ursache für dieses Resultat kann nur ein Matrix-Effekt sein, denn die Funktion der Waage war, ebenso wie die jeweiligen Einwaagen, ständig überprüft worden. Dafür spricht auch, daß bei Verwendung von Clark & Lubs - Puffer der höchste Wert ermittelt wurde, denn der pH-Wert hier war mit 8,0 genau im Bereich des pH-Optimums der Glukoseoxidase. Bei Verwendung des Yellow-Springs-Analysators als Referenzgerät muß daher die Möglichkeit von Abweichungen vom wahren Wert berücksichtigt werden, die zur Über- bzw. Unterbestimmung führen kann. Es ist nicht auszuschließen, daß bei stark gepufferten Realproben mit abweichenden pH-Werten dieser Effekt entsprechend stärker auftreten kann.

Die Messungen mit denselben Lösungen 2 h, 26 h bzw. 62 h nach ihrer Herstellung zeigten geringe, doch signifikante Unterschiede im ermittelten Wert für den jeweiligen Glukose- und Laktatgehalt (Abb. 4.64). Die oben beschriebene Tendenz der Überbestimmungen im Falle des Clark & Lubs - Puffers blieb erhalten, wobei bei allen konzentrationsabhängigen Messungen Linearität bei den ermittelten Glukose- und Laktatgehalten gegeben war. Ein Offset der Meßwerte, also eine Parallelverschiebung in Richtung der Abszisse, war bei den konzentrationsabhängigen Messungen nicht der Fall.

Die Einstellung des Gleichgewichtes von α - und β -Konformation der gelösten Glukose vollzog sich offensichtlich in einem kürzeren Zeitraum. Da die GOD nur die β -Konformation umsetzen kann [11], wäre sonst zeitabhängig ein Driften des ermittelten Glukosegehaltes hin zur Gleichgewichtseinstellung beobachtet worden. Auch bei Messungen frisch hergestellter Lösungen in der FIA wurde ein solcher Effekt nicht festgestellt.

4.2.3 Bioprozessregelung bei Kultivierungen tierischer Zellen

4.2.3.1 Charakterisierung der FIA-Apparatur zur Bioprozessregelung tierischer Zellkulturen

Der prinzipielle Aufbau der hier eingesetzten FIA-Apparatur war in einer früheren Arbeit entwickelt und getestet worden [65]. Das System wurde durch das in der GBF entwickelte Programm FiaFox [70] mit einem PC betrieben. Die in dieser Arbeit durchgeführte Bioprozessanalytik bedeutete die konsequente Fortführung mit dem Ziel, auf der Basis von on-line Glukosemessungen automatisiert die Frischmediumzufuhr bei der kontinuierlichen Kultivierung tierischer Zellen mit Zellrückhaltung im Perfusionsreaktor bis zum Industriemaßstab (100 L) zu regeln.

Zur Ermittlung der erforderlichen Schaltzeiten mit Schläuchen definierter Pumprate (0,7 mL/min; Farbcodierung: orange-orange) wurden drei GOD-Sensoren in die Detektorzellen eingesetzt und eine Glukoselösung [2,0 g/L] vermessen, wobei die Pumpdauer von der Injektion

zum Zeitpunkt des stop-flow variiert wurde (Abb. 4.65).

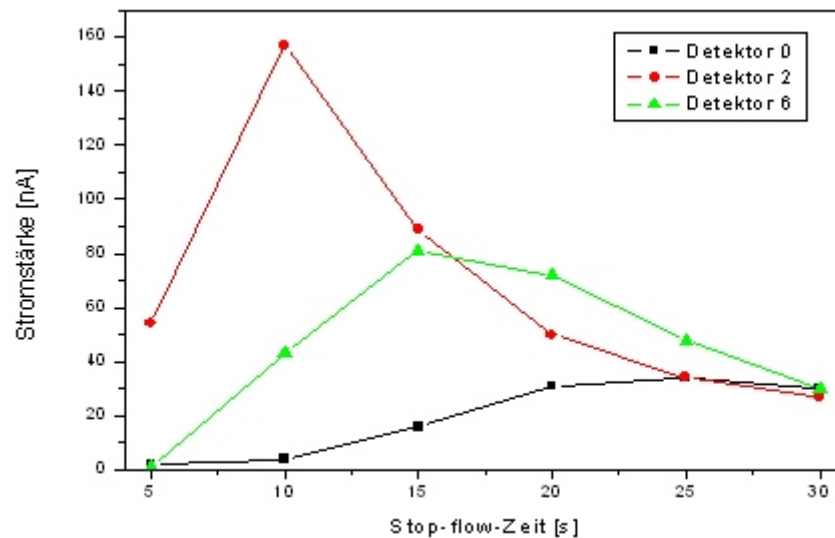


Abb. 4.65: Signalhöhen der drei Glukoseelektroden in den jeweiligen Detektorzellen in Abhängigkeit von der stop-flow-Zeit bei Injektion einer Glukose-Lösung [2,0 g/L]. Die Detektoren 0, 2 und 6 bezeichnen den Meßkanal im Fiafox-Programm und stehen für die Fließzellen 1-3

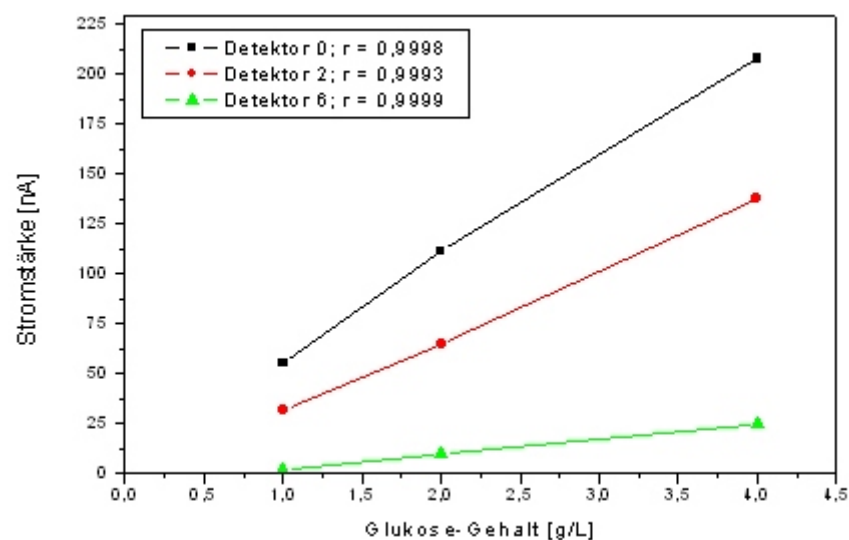


Abb. 4.66: Kalibrierung der drei Detektoren mit GOD-Elektroden in der Bioprozess-FIA. Die Detektoren 0, 2 und 6 bezeichnen den Meßkanal im Fiafox-Programm und stehen für die Fließzellen 1-3

Für die Bioprozessregelung wurde eine Pumpdauer von 17 Sekunden festgelegt, da hierbei mit allen GOD-Detektorzellen ausreichend hohe Stromstärken erzielt wurden. Die Kalibrierung mit den Glukosestandardlösungen ergab in allen drei Fällen Linearität bis zum höchsten verwendeten Standard von 4,0 g/L (Abb. 4.66). Bei diesen Messungen waren die GOD-Elektroden getauscht worden, weshalb die erzielten Stromstärken von denen in Abbildung 4.65 abweichen.

4.2.3.2 Steriltest der FIA-Anbindung und Sterilbrücke im Betrieb

Das Fermentieren im Bioreaktor erfordert den Abschluß des Systems gegenüber Keimen aus der Umgebung zur Vermeidung von Kontaminationen. Grundsätzlich stellt eine an einen Bioreaktor angeschlossene FIA-Apparatur ein entsprechendes Risiko dar. Die zur Bioprozessanalytik bei der Kultivierung von tierischen Zellen eingesetzte FIA-Apparatur war mit einer in regelmäßigen Abständen mit Natronlauge gespülten Sterilbrücke versehen, die während des Betriebes ausreichend Sicherheit bieten sollte. Problematisch ist der Moment der Verknüpfung von dem mit dem Fermenter autoklavierten Verbindungsschlauch und dem 2/3-Wege-Ventil der FIA-Apparatur. Um zu belegen, daß die geschilderte Art der Verknüpfung sowie die regelmäßige Mediumentnahme bei einem Bioreaktor kontaminationsfrei möglich ist, wurde eine Vorratsflasche mit 25 L nicht mehr benötigtem Zellkulturmedium befüllt. Eine angeschlossene Pumpe führte dieses ständig durch einen Silikonschlauch im Kreis, der so einen Fermenter-Bypass simulierte. An einem integrierten T-Stück befand sich der Anschluß mit dem Verbindungsschlauch zur Probenahme. Nach dem Ankuppeln an die FIA-Apparatur, durchgeführt in einer keimfreien Clean-Bench, wurde automatisch im gleichen Turnus wie bei der on-line Regelung Medium entnommen und die Sterilbrücke gespült. Nach 17 Tagen Dauertest war das Medium immer noch ohne Kontamination, die grundsätzliche Eignung dieser Art der Anbindung der FIA-Apparatur an einen Bioreaktor somit gezeigt.

4.2.3.3 Bioprozessregelung von CHO-Zellen in 2-Liter-Perfusionskultur mit Zellrückhaltung

Bei der Kultivierung von rekombinanten CHO-Zellen (Hamster-Zelllinie CHO-3D6) in einer kontinuierlichen 2-Liter-Perfusionskultur mit Zellrückhaltung sollte die Mediumzufuhr durch die on-line Glukosebestimmung der FIA-Apparatur geregelt werden. Die kultivierten CHO-Zellen hatten eine Generationszeit von etwa 36 Stunden, verwendet wurde proteinfreies SMIF-6 Kulturmedium [131]. Ziel der von L. Castilho durchgeführten Fermentation war die Erprobung eines neuartigen Filtersystems mit speziellen Membranen zur on-line Gewinnung von

rekombinantem, humanem Immunglobulin-G, welches von den Zellen während aller Wachstumsphasen ständig gebildet und sezerniert wurde [132].

Der zur Glukosemessung eingesetzte Sensor war nach seiner Herstellung drei Monate trocken bei 4°C aufbewahrt worden. Die PI-Regelung der Perfundatpumpe durch das UBICON-Prozessleitsystem entsprach prinzipiell der Durchführung bei der Kultivierung der HeLa-Zellen im 100-Liter Fermenter (s.u.). Adaptiert wurde lediglich die einzustellende Drehzahl, um dem geringeren Fermentervolumen gerecht zu werden; außerdem kam eine Pumpe mit anderer Kennlinie, also anderer Förderleistung bei gleicher Umdrehungszahl, zum Einsatz. Abweichend von der Integration des T-Stückes mit dem Verbindungsschlauch zur FIA-Apparatur in einen Fermenterbypass war hier der Anschluß im Perfundat-Schlauch, bei geringem Totvolumen, dem Fermenter nachgeschaltet. Dies war aus gerätetechnischen Gegebenheiten nicht anders möglich, es ergaben sich hinsichtlich der Glukosewerte aber auch bei geringen Fließraten keine Unterschiede der off-line Probe zu aus der FIA-Apparatur entnommener Perfundatflüssigkeit. Dies war unabdingbare Voraussetzung zur Prozessierung des von der FIA-Apparatur übermittelten Glukosewertes zur on-line Regelung der Perfundatpumpe.

Die in Vorkulturflaschen herangezogenen CHO-Zellen wurden im Bioreaktor zunächst bei blasenloser Begasung durch das taumelnde Schlauchbündel im Batch kultiviert, bis die Zelldichte wegen des Nährstoffbedarfs den Start der kontinuierlichen Versorgung mit Frischmedium erforderlich machte. Ab der Kultivierungsdauer von 270 h blieben die Parameter der Regelungsgleichung unverändert ($K_p = 0,265$; $K_i = 0,0003$). Abbildung 4.67 zeigt den Verlauf der ständig automatisch von der FIA-Apparatur ermittelten Glukosewerte sowie die infolgedessen vom UBICON-Prozessleitsystem aufgegebenen Drehzahlen der Perfundatpumpe für den Kultivierungszeitraum von 270 h - 360 h.

Der Sollwert war mit 1,5 g/L Glukose festgelegt worden, um ausreichend Sicherheit gegenüber einer unzureichenden Regelung der Mediumzufuhr über Nacht zu haben. Man erkennt über den gezeigten Zeitraum eine ständige Regelung des Glukosegehalts im Fermenter mit dem für eine PI-Regelung typischen Schwingungsverhalten von Regelgröße (Glukosegehalt) sowie Stellgröße (Perfundatpumpe). Die Glukosewerte schwanken innerhalb eines relativ engen, tolerierbaren Intervalls, die Abweichungen vom Sollwert wurden innerhalb weniger Stunden zuverlässig ausgeglichen. Kurzzeitige, offensichtliche Fehlmessungen der FIA-Apparatur wie bei $t = 290$ h und $t = 330$ h führten nicht zum Überschwingen und beeinträchtigten die Regelung nicht nachhaltig. Die Zelldichte (Zellen pro mL), und damit verbunden der Nährstoffverbrauch, änderte sich in diesem Zeitraum bedingt durch Wachstum von $2,6 \cdot 10^6$ ($t = 283$ h) auf $8,3 \cdot 10^6$ ($t = 358$ h), die Regelungsparameter waren dennoch ausreichend für den Mediumverbrauch dieser Zellgehalte.

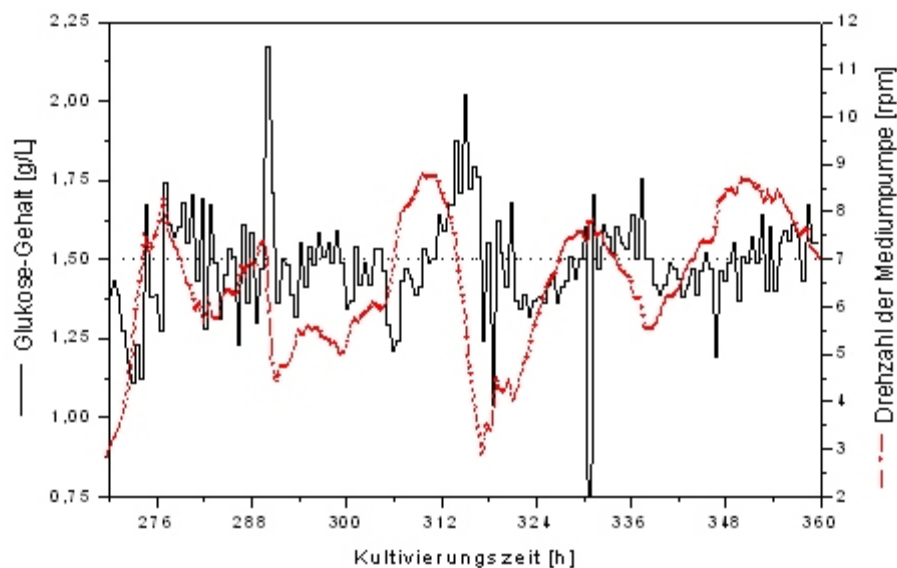


Abb. 4.67: On-line Glukosewerte der FIA-Apparatur und Drehzahlen der Perfundatpumpe ($K_p = 0,265$; $K_I = 0,0003$). Der Sollwert von 1,5 g/L Glukose ist gepunktet dargestellt. Zelldichten (Zellen pro mL): $2,6 \cdot 10^6$ bei 283 h; $3,1 \cdot 10^6$ bei 306 h; $6,0 \cdot 10^6$ bei 329 h; $8,3 \cdot 10^6$ bei 358 h

Die Messungen der FIA-Apparatur waren im gezeigten Kultivierungsbereich generell befriedigend, was die erzielten Stromstärken für die einzelnen Glukosestandardlösungen sowie die Korrelationskoeffizienten betraf. Ein Meßzyklus erforderte rund 35 Minuten, es wurden nacheinander je einmal die Glukosestandardlösungen (0,5, 1,0 sowie 2,0 g/L Glukose) und anschließend die Fermenterprobe vermessen.

Der hier gezeigte Auszug aus den bei der Kultivierung von CHO-Zellen erhaltenen Daten belegt die tatsächlich erfolgte Bioprozessregelung einer Kultivierung tierischer Zellen im 2-Liter-Maßstab. Die im Vergleich zu HeLa-Zellen niedrigere Wachstumsrate der CHO-Zellen bei gleicher Meßfrequenz der FIA-Apparatur ermöglichte ein Arbeiten mit den gewählten Regelungsparametern auch bei den unterschiedlichen Zelldichten. Die relativ lange Generationszeit der CHO-Zellen bewirkt eine erhöhte Trägheit des Systems, Meßfehler bzw. Abweichungen der Regelgröße führen deshalb kaum zu fatalen Konsequenzen wie dauernden Regelabweichungen oder Überschwingungen. Die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Bioprozessregelung bei einer weiteren Kultivierung dieser Zellen in Zusammenarbeit mit L. Castilho zeigte die Eignung dieses FIA-Systems über einen Zeitraum von mehreren Wochen [133].

4.2.3.4 Bioprozessregelung von HeLa-Zellen in 100-Liter-Perfusionskultur

4.2.3.4.1 Ziele der Kultivierung und ihre Randbedingungen

Für externe Forschungszwecke sollten in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der GBF HeLa-Zellen im Kilogramm-Maßstab produziert werden. Eine solche Menge erforderte die Kultivierung im größten in der GBF vorhandenen Fermenter für tierische Zellen mit einem Arbeitsvolumen von 100 L. Der gesamte Aufbau von Fermenter und FIA-Apparatur ist in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt, zur Illustration dient Abbildung 2.5. Nach dem Autoklaviervorgang und Zusammenbau des Fermenters wurde ein Steriltest über drei Tage durchgeführt und anschließend die FIA-Apparatur angeschlossen. Die HeLa-Zellen waren nach dem üblichen Protokoll durch Überimpfen in Kulturflaschen und 2,5 L - Vorfermentern vermehrt und nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl in den Fermenter eingebracht worden, so daß sich eine anfängliche Zelldichte von $1,1 \times 10^5$ Zellen / mL ergab.

Die HeLa-Zellen befanden sich im Kultivierungsbehälter und wurden blasenfrei durch die feinporigen, speziellen Begasungsschläuche mit Sauerstoff versorgt. Nach der anfänglichen Batch-Kultivierung wurde nach Zellwachstum und einhergehendem Nährstoffverbrauch kontinuierlich zellfreies Medium durch das PROSTAK-Modul in den Erntetank abgezogen und Frischmedium aus dem Vorratstank zugeführt. Mit der im Fermenter integrierten Füllstandssonde wurde sichergestellt, daß das Flüssigkeitsniveau stets konstant blieb. Das PROSTAK-Modul diente zur Abtrennung von Partikeln wie Zellkompartimenten aus der Kulturbrühe mittels Querstromfiltration. Im Bypass der Filtratseite war ein T-Stück enthalten, an dem der Anschluß zur FIA-Apparatur angesetzt war. Das Prozessleitsystem UBICON bestimmte die Filtratabfuhr durch die Steuerung der Drehzahl der entsprechenden Peristaltikpumpe. Die Drehzahl konnte grundsätzlich entweder - wie bisher - im vorhinein festgelegt oder auch durch Erstellung einer entsprechenden Routine im Programmablauf basierend auf dem aktuellen Glukosegehalt (Istwert, ermittelt durch die FIA) geregelt werden. Außerdem war es möglich, Mindest- sowie Maximumdrehzahlen zu definieren, um einem eventuellen Ausfall der FIA-Apparatur zu begegnen. Eine solche Betriebsstörung würde sich dann nicht derart gravierend auswirken können, daß die HeLa-Zellen längere Zeit unterversorgt wären oder im anderen Falle in sehr kurzer Zeit der Vorratsbehälter geleert wäre. Dies mußte vor allem über Nacht sichergestellt sein.

Nach Erreichen einer Zelldichte von etwa $1,05 \times 10^7$ Zellen / mL wurde täglich die Hälfte des Fermenterinhalt geerntet und durch Frischmedium ersetzt. Die geernteten HeLa-Zellen wurden abzentrifugiert, konfektioniert und eingefroren. Die Generationszeit betrug in etwa 24 h, so daß die tägliche Zellernte annähernd gleiche Mengen ergab und die Kultivierungsbedingungen sich

bei diesem Verfahren von Tag zu Tag nicht wesentlich unterschieden. Innerhalb weniger Stunden nach dieser Zellernte wurde die Perfusion abhängig von dem Glukosegehalt wieder mit einer bestimmten Pumpendrehzahl und damit Fließrate angefahren.

4.2.3.4.2 Entwicklung der Regelungsstrategie

Begonnen wurde zum Zeitpunkt des Animpfens des Fermenters mit einer je dreifachen Vermessung der Glukosestandards (1,0, 2,0 und 4,0 g/L) und folgender vierfacher Vermessung der Fermenterprobe. Nach diesen Messungen, deren Zeitbedarf 120 min betrug, wurde der ermittelte Glukosewert an das UBICON-Prozessleitsystem übertragen. Zunächst wurde von der FIA-Apparatur also alle 120 min ein Glukosewert ermittelt. Die verwendete Glukoseelektrode war fünf Monate vorher hergestellt und seitdem trocken bei 4°C gelagert worden.

Zunächst wurden die Zellen ca. 67,5 h im Batch kultiviert, bis der Glukosegehalt sich dem gesetzten Minimalwert von 1,0 g/L näherte. Dann wurde mit dem Anlaufen der Perfundatpumpe verbrauchtes gegen frisches Medium ausgetauscht und so die kontinuierliche Kultivierung mit Zellrückhaltung gestartet. Nach 46 h Kultivierungsdauer wurden die Glukosekalibrierlösungen gewechselt (0,5, 1,0 und 2,0 g/L), da der Gehalt im Fermenter unter 2,0 g/L gesunken war. Während in der Batch-Phase die on-line Werte eine gute Übereinstimmung mit den off-line Daten zeigten (Abb. 4.72), ergab sich zu Beginn der Perfusion eine unerwartete Abweichung des FIA-Wertes von der Referenzanalytik (0,83 g/L [FIA] zu 0,52 g/L [YS] Glukose bei $t = 74,8$ h) (Abb. 4.68). Aus diesem Grund wurden in der Folge täglich die FIA-Werte mit den Werten der YS-Referenzanalytik verglichen und der Sollwert entsprechend neu festgelegt. Da die anfänglich ermittelten Werte höher waren als der off-line Referenzwert, wurde der Sollwert höher gesetzt, um dies auszugleichen.

Der Abfragetreiber des UBICON-Prozessleitsystems las in einer der Werteübermittlung der FIA-Apparatur angepassten Taktung den ermittelten Glukosegehalt ein, die anfänglich 60 min betrug. Da der Abfragetreiber zu Beginn nicht zuverlässig alle Werte einlas, wurde die Abfragetaktung gegenüber der Werteübermittlung halbiert, um sicher den Wert zu übermitteln. Der eingelesene Wert wurde zunächst in der Weise verarbeitet, daß durch einfachen Vergleich geprüft wurde, ob der festgelegte Sollwert über- oder unterschritten wurde. Die anfänglich eingestellte Drehzahl der Perfundatpumpe von 5,0 rpm zum Zeitpunkt $t = 67,5$ h wurde für den Fall des Unterschreitens zunächst um 0,5 rpm erhöht, um dadurch die Frischmediumzufuhr zu steigern; im umgekehrten Fall wäre die Pumpe gestoppt worden. Da mit dieser Drehzahländerung das System eine zu große Trägheit aufwies, also die Abweichungen nicht zeitnah ausgeglichen werden konnten, wurde die Drehzahlerhöhung auf 2,0 rpm (ab 72,85 h) abgeändert. Bei Überschreitung des Sollwertes wurde die Pumpe gestoppt, bei Unterschreitung wieder mit der

letzteingestellten, um je 0,5 rpm pro seitdem erfolgter Abfrage erniedrigten Drehzahl gestartet. Dies erwies sich als zu starke Änderung der Frischmediumzufuhr, das System begann im Zeitraum von 84 h - 116 h stark zu oszillieren. Als Konsequenz wurde die Drehzahländerung mit 1,0 rpm (ab 116,0 h) neu festgelegt, wobei die Drehzahl bei Unterschreitung des Sollwertes erhöht, bei Überschreitung erniedrigt wurde. Im Vergleich zu vorher ergab sich ein gleichförmigerer Glukosegehalt über die folgenden 22 h. Abbildung 4.68 zeigt die ermittelten Glukosewerte der FIA im Vergleich zu den niedrigeren off-line Referenzwerten für den Kultivierungszeitraum von 67,5 h (Perfusionsstart) bis 140 h dem Zeitpunkt der ersten Zellernte.

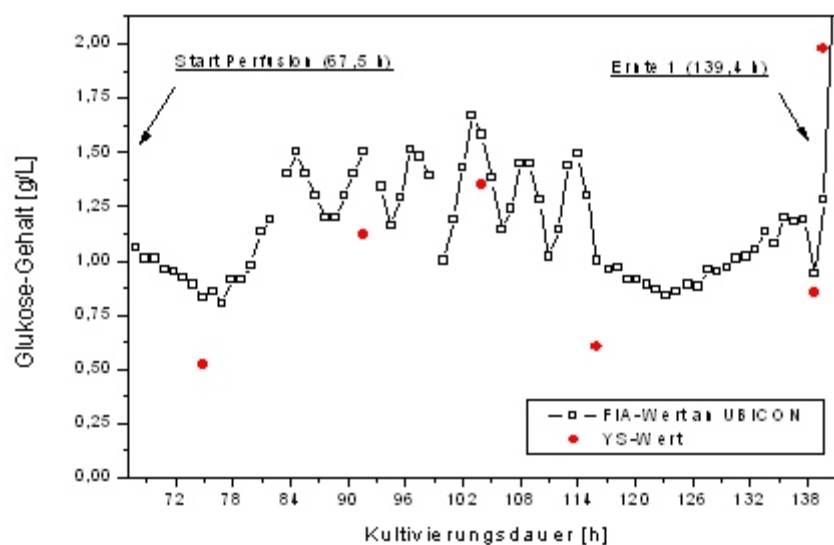


Abb. 4.68: Einfache Sollwertreglung (72 h - 138 h); Glukose-Sollwert: 1,2 g/L; Abfrage des UBICON-Treibers alle 60 min; rpm-Änderung: bis 71,85 h: 0,5, ab 72,85 h: 2,0, ab 116,0 h: 1,0

Es handelte sich bei der Regelung der Perfundatpumpe ab der Kultivierungsdauer von 116,0 h um eine einfache Festwertregelung, bei der die gewählte Änderung der Stellgröße in beide Richtungen ausreichend war, um einen gleichbleibenden Glukosegehalt von 1,0 g/L \pm 0,2 g/L im Fermenter zu gewährleisten. Diese einfache Art der Regelung war angesichts der Bedeutung dieser Kultivierung zunächst angeraten, darüber hinaus diente sie der Datengewinnung, um die Parameter in der Regelungsgleichung der angestrebten PI-Regelung festlegen zu können. Die Vitalität der Zellen war stets höher als 95 % (Abb. 4.75).

In den folgenden 6 Tagen oder 144 h wurde diese Festwertregelung prinzipiell beibehalten, es ergaben sich jeweils unterschiedliche Verläufe der Drehzahlen in den nun täglichen Zyklen (Abb. 4.73). Diese wurden durch jeweils leicht unterschiedliche Anfangsdrehzahlen mitverursacht, die zum Zeitpunkt des erneuten Perfusionsstarts individuell gesetzt wurden, um die jeweils variierenden Verhältnisse im Fermenter zu berücksichtigen.

In der Regel wurde die Perfusion automatisch bei einem Glukosegehalt von 1,2 g/L gestartet. Da die FIA reproduzierbare Werte lieferte, wurde die Analysendauer nach 190,75 h Kultivierung verkürzt, indem auf die Mehrfachbestimmungen verzichtet und sowohl die 3 Standards als auch die Probe nur einfach vermessen wurden. Der Zeitbedarf für einen Analysezyklus betrug nun etwa 35 min, die Abfrage des UBICON-Treibers las ab diesem Zeitpunkt alle 30 min den übermittelten Wert ein. Ziel dieser Quasi-Verdoppelung der Übermittlungsfrequenz war eine schnellere Angleichung des Glukosegehaltes an den Sollwert und damit gleichmäßigere Kultivierungsbedingungen, außerdem sollte die Auswirkung gelegentlich auftretender Fehlschaltungen des Selektionsventils (wie bei $t = 170$ h) minimiert werden, die zu einem unzutreffenden Meßwert führten. Der Vergleich der aufeinanderfolgenden Kultivierungszyklen mit den beiden unterschiedlichen Abfragefrequenzen des UBICON-Systems ergab eine verbesserte Regelung, da im Unterschied zum Zyklus zwischen den Zellernten 2 und 3 der eingestellte Sollwert zwischen den Ernten 3 und 4 tatsächlich bereits nach 3 h erreicht wurde (Abb. 4.69). Allerdings dauerte es nach dem Überschreiten des Sollwerts 8 h, bis er durch sukzessive Reduzierung der Drehzahl wieder erreicht wurde. Die Abweichungen des FIA-Wertes zum eingestellten Sollwert waren geringer als 0,3 g/L, was keine Beeinträchtigung des Wachstums der HeLa-Zellen zur Folge hatte.

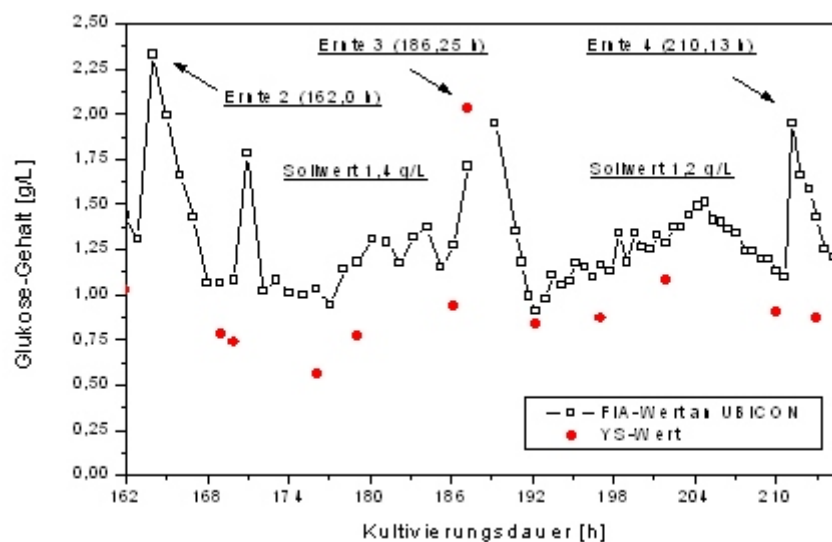


Abb. 4.69: Einfache Sollwertregelung (162 h - 210 h); Glukose-Sollwert: zwischen Ernte 2 und 3: 1,4 g/L, zwischen Ernte 3 und 4: 1,2 g/L; Abfrage des UBICON-Treibers bis 188,25 h alle 60 min, ab 190,75 h alle 35 min; rpm-Änderung: 1,0

In den folgenden drei Zyklen zeigte sich unter Beibehaltung des FIA-Programmablaufs sowie der Einlesefrequenz, jedoch bei täglich unterschiedlicher Sollwerteinstellung und Perfusionsstart

bei verschiedenen Glukosegehalten im Fermenter, ein ähnlicher Verlauf des Glukosegehaltes (Abb. 4.70). Zwischen den Zellernten 6 und 7 wurde aufgrund des niedrigen Anfangsgehaltes an Glukose der Sollwert erst kurz vor dem Ende erreicht. Insgesamt ergab sich in diesen Zyklen eine ausreichende Prozessregelung, die durch eine leichte Erhöhung der jeweiligen Drehzahländerung der Perfundatpumpe und dadurch dynamischerem Ansprechen des Stellglieds verbessert ausgefallen wäre. Der Sollwert wäre dann zu einem früheren Zeitpunkt erreicht worden, das gesamte System hätte dann dynamischer um diesen geschwungen.

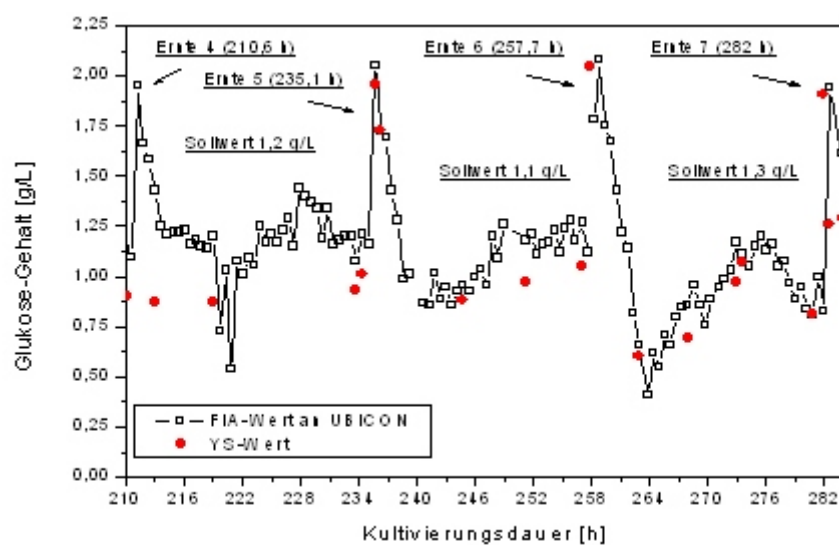


Abb. 4.70: Einfache Sollwertregelung (216 h - 276 h); Glukose-Sollwert: zwischen Ernte 4 und 5: 1,2 g/L, zwischen Ernte 5 und 6: 1,1 g/L, zwischen Ernte 6 und 7: 1,3 g/L; Abfrage des UBICON-Treibers alle 35 min; rpm-Änderung: 1,0

Ausgehend von den im bisherigen Verlauf der Kultivierung gesammelten Erfahrungswerten wurde im UBICON-System eine PI-Regelungsroutine von J. Nothnagel implementiert. Der Proportionalbeiwert sowie die Integrationskonstante in der Regelungsgleichung wurden derart gewählt, daß eine ähnliche Dynamik der Mediumzufuhr bei Abweichungen vom Sollwert erreicht wurde. An das UBICON-System wurde von der FIA-Apparatur nun der ermittelte Wert eines anderen Glukosesensors übertragen, der im Verlauf von mehreren Tagen in einer parallelen Detektorzelle praktisch gleiche Werte wie die YS-Referenzanalytik erbracht hatte. Der Sollwert wurde auf 0,9 g/L reduziert, was zum einen die relativ robusten HeLa-Zellen im Wachstum nicht beeinflusste, zum anderen auch das teure Medium sparen sollte. Sowohl der Programmablauf der FIA-Apparatur als auch die Einlesefrequenz des UBICON-Systems blieben unverändert. Die Regelungsgleichung im UBICON-Algorithmus war wie folgt definiert:

$$\text{rpm (Perfundatpumpe)} = 0,265 * [\text{Regeldifferenz}] + 0,00130 * \int [\text{Regeldifferenz}] dt$$

(Proportionalbeiwert $K_p = 0,265$)

(Integrationsbeiwert $K_I = 0,00130$)

Ermöglicht wurde dadurch im Vergleich zur vorherigen einfachen Festwertregelung ein dynamisches und variables Ansprechen der Perfundatpumpe. Im Kultivierungszyklus zwischen den Zellernten 7 und 8 ist ersichtlich, daß der eingestellte Sollwert zwar auch erst nach sieben Stunden erreicht wurde, der Verlauf der FIA-Werte jedoch eine allmähliche Annäherung zeigt (Abb. 4.71).

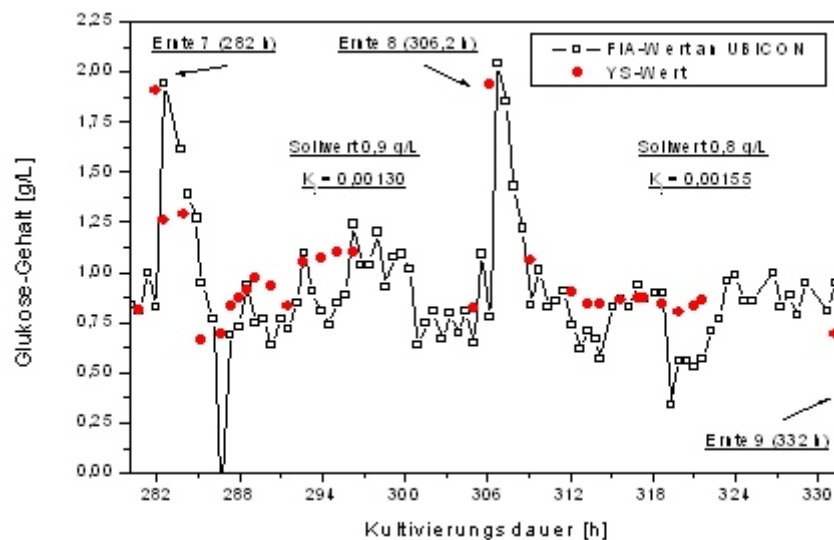


Abb. 4.71: PI-Regelung (282 h - 330 h); Glukose-Sollwert: zwischen Ernte 7 und 8: 0,9 g/L, zwischen Ernte 8 und 9: 0,8 g/L; Abfrage des UBICON-Treibers alle 35 min; K_p : 0,265; K_I zwischen Ernte 7 und 8: 0,00130, zwischen Ernte 8 und 9: 0,00155; GOD-Elektrode neu (Polylysin als Additiv)

Die Abhängigkeit der Drehzahl von den jeweils zuvor ermittelten Glukosegehalten ist klar ersichtlich (Abb. 4.73), im Vergleich zu den in den bisherigen Zyklen angewandten einfachen Festwertregelungen ist die Reaktion der Perfundatpumpe insgesamt dynamischer. Die FIA-Werte sind allerdings nicht über den gesamten Zyklus mit den off-line Werten des Yellow-Springs-Analysators deckungsgleich, was möglicherweise auf die lange Einsatzdauer und damit verbundenem Verschleiß mit Schwankungen der Fließraten der Peristaltikpumpschläuche zurückzuführen ist. Immerhin zeigen die off-line Werte einen fast einheitlichen, leicht

ansteigenden Verlauf bis etwa 1,1 g/L Glukose bei der Kultivierungsdauer von 296 Stunden. Die Betrachtung der Regelung ausschließlich in bezug auf die FIA-Werte ist aufgrund der offensichtlichen gerätebedingten Schwankungen dennoch aufschlußreich. Trotz der beobachteten Abweichungen der FIA-Werte vom YS-Referenzwert wurde der eingestellte Sollwert erreicht, außerdem war der Verlauf des Glukosegehaltes bis zur Ernte gleichförmiger als bei den einfachen Festwertregelungen. Günstiger wäre dennoch ein dynamischeres Ansprechen der Perfundatpumpe gewesen, um den Sollwert schneller zu erreichen bzw. Abweichungen schneller auszugleichen. Eine entsprechende Änderung der Parameter in der Regelungsgleichung erschien deshalb sinnvoll. Zudem führten Veränderungen der Drehzahl der Perfundatpumpe als Konsequenz aus Abweichungen nicht zu kurzfristigen deutlichen Schwankungen des Glukosegehaltes. Deshalb wurde die Integrationskonstante im anschließenden Zyklus bis zur Zellernte 9 von 0,00130 auf 0,00155 erhöht. Außerdem wurde der Sollwert auf 0,8 g/L Glukose abgesenkt, da die FIA-Apparatur zuverlässige Werte lieferte und auch bei diesem Glukosegehalt eine hohe Vitalität der Zellen zu erwarten war. Die FIA-Werte zeigten auch hier in zwei Zeiträumen (311 h - 315 h bzw. 319 h - 323 h) für mehrere Messungen Abweichungen nach unten relativ zur Referenzanalytik. Trotzdem ergab sich insgesamt ein noch gleichmäßigerer Verlauf des Glukosegehaltes (Abb. 4.71). Die Erhöhung des Integrationsbeiwerts hatte sich nicht nur als zweckmäßig erwiesen, sondern es zeigte sich darüber hinaus, daß die Frequenz der Messungen hoch genug war, um auch bei mehreren aufeinanderfolgenden, offensichtlich in dieser Größenordnung zu niedrig gemessenen Werten eine funktionierende Regelung der Mediumzufuhr zu ermöglichen. Eine weitere Adaption der Regelungsparameter konnte leider nicht durchgeführt werden, da wegen einer mikrobiellen Kontamination im Fermenter die Kultivierung beendet werden mußte.

4.2.3.4.3 Betrachtung des gesamten Kultivierungsverlaufes

Die Regelung der Frischmediumzufuhr durch die der Perfundatpumpe aufgegebene Drehzahl war bei den angewandten Regelungsstrategien erfolgreich, auch wenn die on-line Werte der FIA-Apparatur bis zur Kultivierungsdauer von etwa 240 h vom Referenzwert abwichen (Abb. 4.72). Insbesondere bei den letzten zwei Zyklen mit der PI-Regelung erkennt man das typische Schwingungsverhalten des Istwerts um den Sollwert, was sich ebenfalls in den Drehzahlen der Perfundatpumpe wiederfindet (Abb. 4.73). Die Zahlenwerte für den Proportionalbeiwert wie auch für die Integrationskonstante waren befriedigend gewählt, eine weitere Annäherung an die optimalen Werte hätte nur noch zu minimalen Änderungen geführt. Entscheidender wäre dabei ohnehin gewesen, das (manuelle) Einsetzen des Perfusionsbetriebes und dessen Regelung nach der Zellernte zu einem Zeitpunkt zu ermöglichen, zu dem die Bedingungen im Fermenter

hinsichtlich des Glukosegehalts exakt gleich waren. Dies war aber aufgrund der relativ schnellen Nährstoffaufnahme der kultivierten Zellen und dem damit verbundenen schnellen Abfall des Glukosegehalts kaum machbar. Außerdem richtete sich der Perfusionsstart nach den Resultaten der off-line-Analytik, die täglich nach den Zellernten nur ein- bis zweimal durchgeführt wurde.

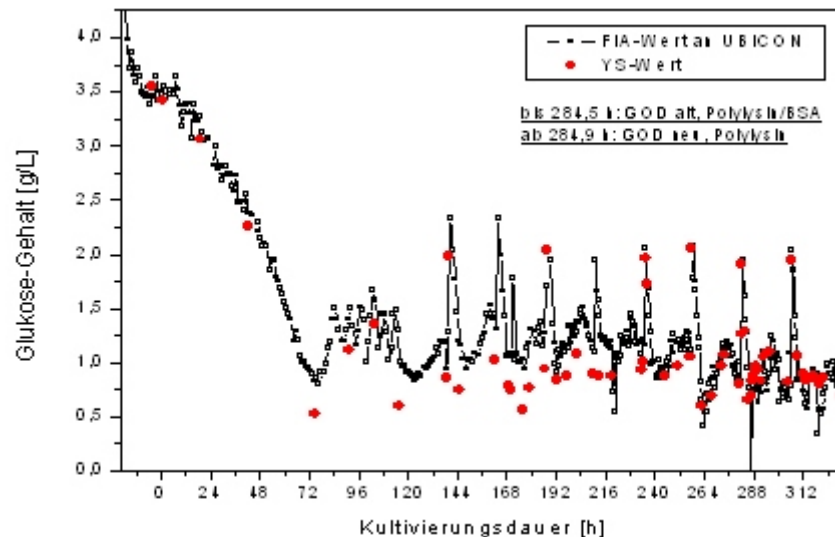


Abb. 4.72: Übersicht der on-line (FIA) und off-line (YS) Glukosewerte während des gesamten Kultivierungszeitraums

Die Abweichung des ermittelten Glukosewertes vom Referenzwert des Yellow-Springs-Gerätes war nicht nachteilig, da sie bei Festsetzung des Sollwerts berücksichtigt werden konnte. Diese Abweichung war vermutlich in der Herstellung der Elektrode begründet und konnte als Offset aufgefaßt werden. Aufgrund der Konstanz mußte die Elektrode auch nicht sofort ausgetauscht werden - für die Kultivierung an sich war der Offset ohnehin belanglos, solange seine Größe gleichbleibend war. Ein Wechsel zu einer anderen Elektrode wurde zunächst als zu riskant angesehen, da die Arbeitsstabilität dieser nicht bekannt war.

Erst nach einer Kultivierungsdauer von 282 h wurde eine andere GOD-Elektrode (nur Polylysin als Additiv) als Detektor für die Regelung definiert, da sie an den vorangegangenen Tagen mit der Referenzanalytik fast übereinstimmende Werte ergeben hatte. Dementsprechend wurde auch der Sollwert angepaßt.

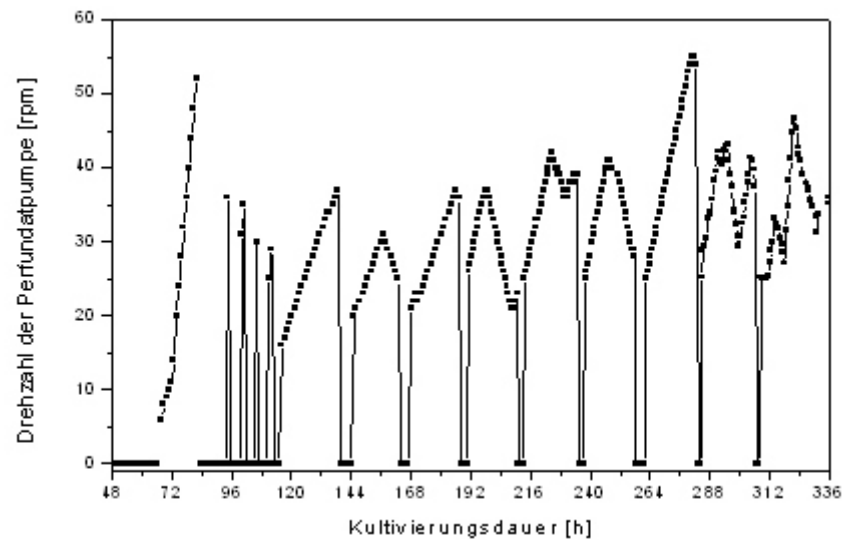


Abb. 4.73: Drehzahl der Perfundatpumpe über den Kultivierungszeitraum von 48 h bis 336 h

Die Arbeitsstabilität der ersten verwendeten GOD-Elektrode war über den gesamten Kultivierungszeitraum derart gegeben, daß die resultierenden Signale ausreichend hoch waren (Abb. 4.74); der Korrelationskoeffizient der Kalibrierungen war in der Regel größer als 0,998.

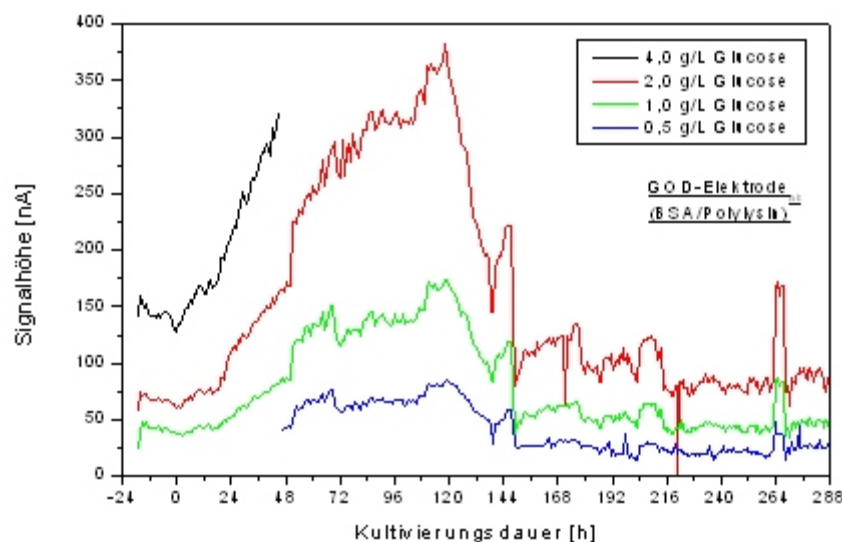


Abb. 4.74: Signalthöhen der Regelungselektrode (von -24 h bis 288 h); Animpfen bei $t = 0$ h

Tatsächlich stiegen die erhaltenen Signale für die Kalibrierlösungen über den Zeitraum von 24

h bis 120 h kontinuierlich an, um dann in den nächsten 24 h auf das ursprüngliche Niveau abzufallen und bis zum Zeitpunkt 288 h nur noch sehr allmählich zu sinken. Die Ursache dieses Verhaltens ist nicht bekannt, möglicherweise wurde die Enzymmembran durch den Einsatz im Fließsystem zunächst freigespült, was eine effektivere Diffusion und somit höhere Signal bewirkte. Ein Ansteigen der Signale bei den ersten Messungen war auch schon bei Elektroden mit immobilisierter HRP festgestellt worden (nicht gezeigt). Der Abfall ab 120 h könnte durch einen Ablösungsprozess eines Teils der Membran begründet sein. Immerhin konnte diese Elektrode über zwölf Tage ohne Unterbrechung eingesetzt werden, mit etwa 7 Messungen/h, d.h. für insgesamt etwa 2000 Messungen.

Die Vitalität der kultivierten HeLa-Zellen betrug generell über den gesamten Zeitraum über 95 %, was die gleichbleibend guten Wachstumsbedingungen im Fermenter anzeigt (Abb. 4.75). Ersichtlich ist hier auch die Verdoppelung der Zellzahl innerhalb der knapp 24stündigen Zyklen zwischen den einzelnen Zellernten mit annähernd gleich großen Zellmassen, die durch ebendiese Generationszeit der Zellen bedingt ist.

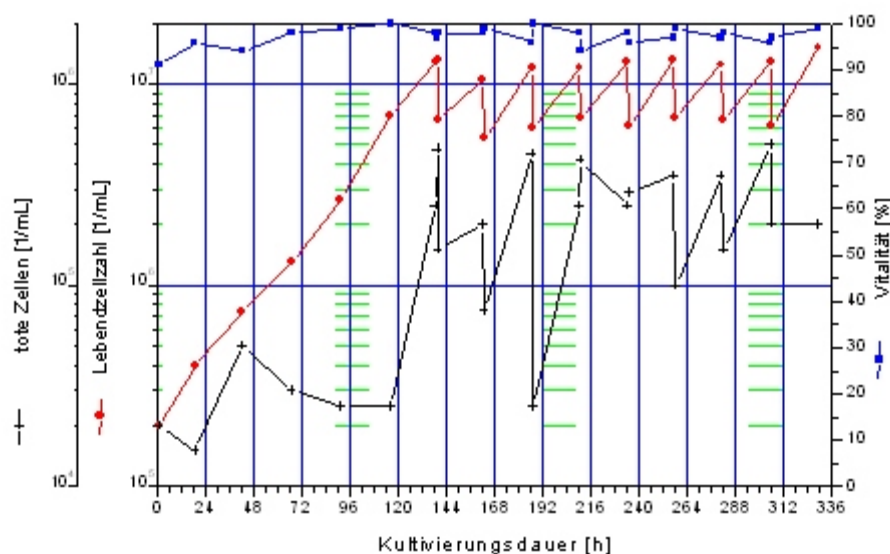


Abb. 4.75: Vitalität und Lebendzellzahl während der HeLa-Kultivierung (Abb. aus Fermentationsprotokoll G.W. Piehl)

4.2.3.5 On-line Bioprozessmonitoring mit LOD-Dickschicht-Elektroden

Bei einer Kultivierung tierischer Zellen (K4E7 Hybridomzellen) im 2-Liter Perfusionsreaktor mit Zellrückhaltung wurde der Laktat-Gehalt on-line bestimmt. Die Perfusionsrate wurde manuell nach Erfahrungswerten eingestellt. Abweichend von dem im Methodenteil vorgestellten Programmablauf war bei dieser Kultivierung in regelmäßigen Abständen zunächst eine Kalibration mit jeweils dreifacher Vermessung der Standardlösungen und nachfolgender vierfacher Vermessung der Probenflüssigkeit durchgeführt worden. Die zeitliche Dauer einer solchen Serie betrug 2 h.

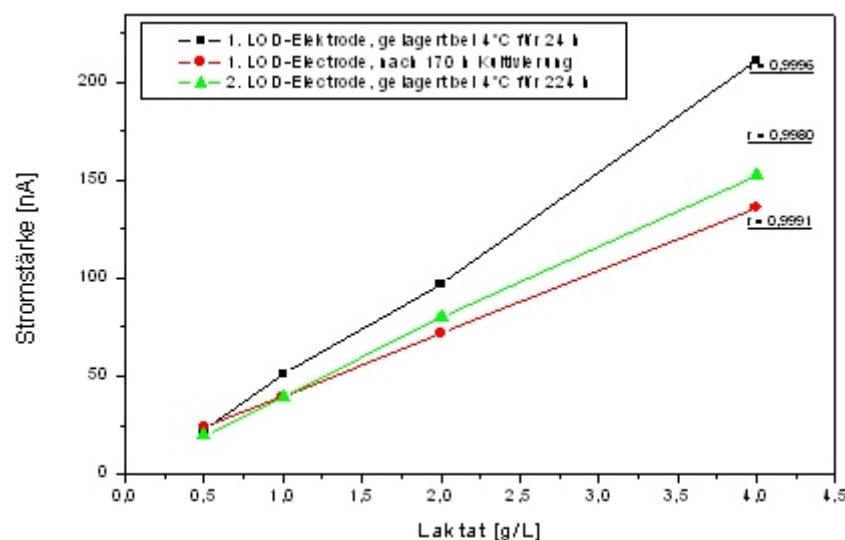


Abb. 4.76: Kalibrierung der beiden verwendeten LOD-Elektroden

Die Kalibration der (neu) hergestellten Elektrode ergab eine sehr gute Linearität bei Vermessung der Laktatkalibrierlösungen bis 4 g/L (Abb. 4.76). Ebenso war die Arbeitsstabilität über einen Kultivierungszeitraum von 170 h praktisch konstant, der Vergleich des sich ergebenden Laktat-Gehaltes aufgrund der Kalibrierung stimmte ausreichend gut mit der Referenzmethode überein (Abb. 4.77). Die Aktivität der Enzymelektrode ließ erst in der Folgezeit langsam nach.

Der Austausch dieser LOD-Elektrode gegen eine, die am selben Tage hergestellt und über 200 h trocken bei 4°C aufbewahrt worden war, erbrachte Signale in etwa der Höhe, wie die zuerst eingesetzte Elektrode nach 170 h Dauereinsatz (Abb. 4.76). Offensichtlich ist der Verlust an enzymatischer Aktivität während der Nutzung mit dem durch Lagerung vergleichbar. Weiterführende Aussagen können nicht getroffen werden, da keine weiteren Untersuchungen von LOD-Elektroden vorgenommen wurden. Die Eignung dieser LOD-Elektroden zur on-line

Laktatanalytik ist aber dennoch mit diesen Messungen belegt.

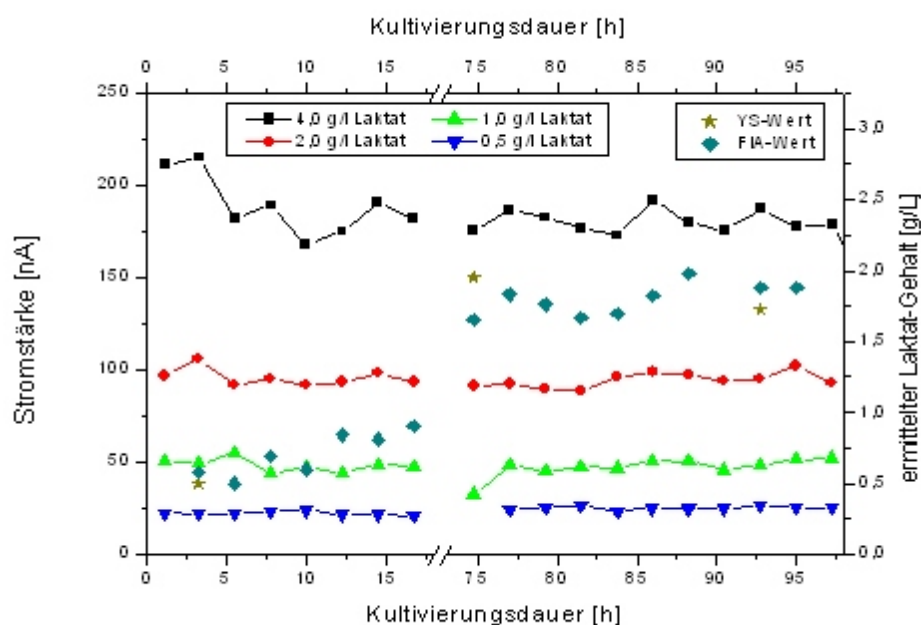


Abb. 4.77: Arbeitsstabilität der verwendeten LOD-Elektrode und Vergleich der ermittelten Laktat-Werte mit der YS-Referenzanalytik (Gesamtzellzahl: zu Beginn ca. $2 \cdot 10^5$, nach 72 h um $14 \cdot 10^5$ Zellen / mL)

4.2.4 Diskussion der Resultate mit GOD- und LOD-Elektroden

Im Perfusionsbetrieb konnte mit dem automatisierten FIA-System mit integrierten GOD-Dickschicht-Elektroden über Wochen Bioprozessanalytik durchgeführt werden. Die Entwicklung der PI-Regelung der kontinuierlichen Kultivierungen mündete in der erfolgreichen Anwendung im 100- sowie 2-Liter-Maßstab. Der Verlauf der Drehzahlen der Perfundatpumpe bei der Kultivierung im 100-Liter-Fermenter (Abb. 4.73) zeigt ein typisches Schwingungsverhalten der Drehzahlen als Stellgröße während der aktiven PI-Regelung. Ebenso konnte später die Eignung dieses Aufbaus über Wochen im 2-Liter-Maßstab gezeigt werden. Die Lagerstabilität über Monate sowie Standzeiten von Wochen der GOD- und LOD-Enzymelektroden zeigten, daß bei Verwendung der stabilisierenden Zusätze die Enzymmembranen ausgereift sind. Die aufgetretenen Abweichungen des ermittelten Wertes relativ zur off-line Referenzanalytik bei Glukose hatten ihre Ursache offensichtlich im

Herstellungsprozess der Sensoren. Die einzelnen Platin-Elektroden wiesen beim chronoamperometrischen Test (Wasserstoffperoxid-Umsatz) relativ hohe Standardabweichungen auf. Zusätzlich kann das manuelle Bedrucken mit UV-Paste zu leicht unterschiedlichen Membraneigenschaften führen. Die Abweichungen der on-line Werte waren jedoch im allgemeinen konstant und konnten als Offset angesehen werden. Berücksichtigt werden muß auch die Beeinflussung des Referenzgerätes durch das verwendete Lösungsmittel. Es ist möglich, daß das Referenzgerät seinerseits leichte Abweichungen vom wahren Wert liefert, was die Differenzen zum ermittelten on-line Wert der FIA relativieren kann.

Die Diffusionseigenschaften der GOD-Membran sowie der BSA-Membran waren unterschiedlich hinsichtlich der interferierenden Substanz Ascorbinsäure. Das zusätzliche Überdrucken der Enzymmembran mit einer weiteren (BSA-)Membran konnte dieses Interferieren entscheidend minimieren. So konnte auch Bioprozessmonitoring bei *Aspergillus*-Kultivierungen durchgeführt werden, bei denen offensichtlich unbekannte Störsubstanzen auftreten und zu unzutreffenden Meßwerten führen können.

Bei Verwendung des hier entwickelten, autoklavierbaren Anschlußmoduls von Fermenter zu FIA-Apparatur war - in Kombination mit der Sterilbrücke - die Gefahr einer Kontamination praktisch ausgeschlossen. Insgesamt bot das hier verwendete System mit den Dickschicht-Elektroden die Voraussetzung zum Dauereinsatz zur Bioprozessregelung tierischer Zellkulturen. Die Einsatzmöglichkeit auch über mehrere Wochen ist durch die Automatisierung und die Sterilbrücke sowie die Standzeiten der Sensoren gegeben. Vergleichbar ist dieses System mit dem beschriebenen Aufbau in [134]. Dort wurde ein Yellow-Springs-Analysator mittels eines Probenahmemoduls (ebenfalls mit Sterilbrücke) an den Bypass einer Querstromfiltrationseinheit eines Fermenters (Volumen: 12-Liter) angeschlossen. Die Perfusionsrate der Kultivierung einer Hamsterzelllinie wurde mit den erhaltenen on-line Glukosewerten geregelt, es konnte ein Meßwert pro Stunde erhalten werden. Die YS-Geräte neuester Bauart sind bereits seitens des Herstellers mit Modul und Rechnerschnittstelle versehen. Künftig wird sicherlich die Entwicklung von Systemen mit (dampfsterilisierbaren) Dialysemodulen zu universell einsetzbaren Komplettgeräten mit integrierten Biosensoren führen [135].

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit der Darstellung von direktem Elektronentransfer von (Graphit-)Dickschicht-Elektroden auf das immobilisierte Enzym Peroxidase aus Meerrettich (engl.: HRP) wurde ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit erreicht. Hergestellt wurden die zur Serienfertigung geeigneten Enzymelektroden im Siebdruck, das Enzym wurde in Lösung aufgebracht und nach Adsorption durch Überdrucken mit einer durch UV-Licht polymerisierbaren Membran fixiert. Der direkte Elektronentransfer zur Rereduktion der HRP konnte in Anwesenheit des natürlichen Substrats Wasserstoffperoxid mit amperometrischer Detektion bei einem Arbeitspotential von -100 mV (bezogen auf eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode) sowohl mit dem nativen, glykosilierten Protein wie auch mit rekombinant hergestelltem, unglykosilierten Protein nachgewiesen werden. Die linearen Bereiche erstreckten sich generell bis maximal 100 μM Wasserstoffperoxid bei Empfindlichkeiten zwischen etwa 0,08 und 0,68 $\mu\text{A} / (\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ mm}^2)$. Das maschinelle Polieren der Dickschicht-Elektroden vor dem Aufbringen der Enzymschicht steigerte die Stromausbeute um etwa den Faktor 2. Mit zyklischer Voltametrie wurde außerdem direkter Elektronentransfer mit dem nativen Enzym im Potentialbereich von +200 mV bis -300 mV gezeigt, was sehr gut mit Literaturdaten korrespondiert.

Der Einsatz von geladenen Polymeren als Additiv erbrachte insbesondere im Falle von Gafquat 755N und Dextran-Sulfat eine signifikante Erhöhung der erhaltenen Ströme für beide Enzymvarianten. Ebenso zeigte sich ein stark verbessertes Verhalten hinsichtlich der Ansprechzeit der Sensoren, was seine Ursache sehr wahrscheinlich in einer durch die Additive begründeten, speziellen Ausbildung der Proteinschicht hat. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivitäten der jeweiligen Enzyme in Lösung kann eine Stabilisierung der Proteine während der Immobilisierung durch diese Additive postuliert werden. Modellrechnungen der Abteilung Strukturforschung der GBF konnten eine jeweils starke, doch unspezifische Anlagerung der Additive an die Enzymoberflächen belegen. Bevorzugte Bereiche wie etwa die aktiven Zentren der Enzyme waren jedoch nicht erkenntlich, weshalb eine spezifische Wechselwirkung aufgrund dieser Resultate nicht als Erklärung für eine beobachtete Aktivierung bzw. Stabilisierung der Peroxidasen dienen kann. Vielmehr deuten die experimentellen Befunde für das native Enzym in Lösung unter Berücksichtigung der Modellrechnungen auf eine Stabilisierung der Proteinkonformationen durch einfache Anlagerung der Additive hin, die dadurch die Auffaltung und folgende Denaturierung erschweren.

Die Erhöhung der Signale des direkten Elektronentransfers bei Einsatz der Additive auf den Dickschicht-Elektroden kann nicht auf einen erleichterten Elektronenübergang zurückgeführt werden. Ebenso kommt aufgrund weiterer Modellrechnungen aus der Abteilung Strukturforschung der GBF auch eine Steigerung des Elektronentransfers durch eine bevorzugte

Ausrichtung der Enzyme zur Elektrode infolge der Wechselwirkungen mit den Additiven nicht in Betracht. Die rechnerisierte Ausrichtung der Enzyme hatte keine besonderen Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Orientierung zur Elektrode in Kombination mit den Elektronentransfer begünstigenden Oberflächenbereichen ergeben. Eine gewünschte Voraussage des Umfanges des direkten Elektronentransfers bei Einsatz ausgewählter Additive ist daher weiterhin nicht möglich. Die Modellrechnungen ergaben allerdings Elektronentransferraten in gleicher Größenordnung für das native und rekombinante Enzym, wenn die Glykosilierungskortex am Protein anliegt und nicht - wie in Lösung - radial absteht. Tatsächlich ist dieses enge Anliegen der Zuckerseitenketten an die Oberfläche der nativen HRP im Vakuum der Fall, was auf die trockene Enzymschicht auf der Elektrodenoberfläche übertragbar ist und so die experimentellen Befunde bestätigt. Allerdings war die Stromausbeute des direkten Elektronentransfers aufgrund der erheblich niedrigeren Elektronentransferraten verglichen mit Mediatormessungen relativ gering, außerdem zeigten die Elektroden nur eine geringe Stabilität. Die tatsächliche Einsatzmöglichkeit solcher Elektroden mit dem Enzym HRP beispielsweise in einem kommerziellen, bienzymatischen Sensor erscheint daher nicht gegeben.

Aus diesem Grund kamen zur Bioprozessregelung von kontinuierlichen Kultivierungen tierischer Zellen bereits bewährte (Platin-)Dickschicht-Elektroden zum Einsatz. Diese wurden mit einer durch UV-Licht polymerisierbaren Paste beschichtet, in die das Enzym Glukoseoxidase mit den stabilisierenden Additiven Polylysin und BSA eingemischt war. Detektiert wurde amperometrisch das enzymatische Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid in Anwesenheit des Substrates Glukose, die gemessene Stromstärke war indirekt ein Maß für den Glukosegehalt der Probenflüssigkeit. Es resultierten Sensoren mit einer Lagerzeit von mehreren Monaten sowie einer Verwendungsfähigkeit im Einsatz von mehreren Wochen. Diese GOD-Elektroden wurden als Detektionseinheiten in einem Fließinjektions-Analyse-System eingesetzt, welches mittels einem in dieser Arbeit entwickelten, autoklavierbaren Adaptermodul an einen 2-Liter bzw. 100-Liter Fermenter angeschlossen wurde. Die automatisierte Vermessung von Kalibrierlösungen gefolgt von Fermenterprobe führte zur ständigen Autokalibration mit anschließender Ermittlung eines Glukosemeßwertes, der in einer halbstündigen Taktung dem übergeordneten Prozessleitsystem übermittelt wurde. Abhängig vom ermittelten Wert wurde dann die Frischmediumzufuhr geregelt, damit der Glukosegehalt im Fermenter nicht unter einen kritischen Wert fiel. Eingesetzt wurde dabei eine PI-Regelungsroutine, die nicht nur den aktuellen, sondern auch längerfristigen Glukosegehalt über mehrere Stunden berücksichtigte und Abweichungen vom Sollwert zuverlässig ausregeln konnte. Insgesamt stellt die hier eingesetzte FIA-Apparatur ein ausgereiftes und betriebssicheres System zur Bioprozessregelung tierischer Zellkulturen dar, zumal auch mit Laktatoxidase-Elektroden gute Resultate erzielt wurden. Der weitere Einsatz bei künftigen Kultivierungen tierischer Zellen kann ausdrücklich empfohlen werden.

6 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

A	Ampere
A	Fläche
Å	Ångström [10^{-10} m]
AFM	Atomic Force Microscopy
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Elektrode
BQ	para-Benzochinon
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
BTM	Biotrockenmasse
C	Coulomb [$A*s$]
CHO	Hamsterzellen (Chinese Hamster Ovary; Hamster-Zelllinie CHO-3D6)
CV	zyklisches Voltamogramm (engl.: Cyclo-Voltammetry)
C&L	Clark & Lubs
det	direkter Elektronentransfer
Da	Dalton
D	Dispersionskoeffizient
DS	Dickschicht
F	Faraday-Konstante (96485 [$A*s*mol^{-1}$])
FCS	fötale Kälberserum (engl.: Fetal Calf Serum)
FIA	Fließinjektions-Analyse
g	Gramm
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GC	Glassy Carbon
GOD	Glukoseoxidase
GRASP	Graphical Representation of Surface Properties
h	Stunde
HQ	Hydrochinon
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
I	Stromstärke [A]
k	kilo
K_i	Integrationsbeiwert (-konstante)
K_p	Proportionalbeiwert (-konstante)
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter
LMW	low molecular weight
LOD	Laktatoxidase
m	milli
M	molar

MG	Molekulargewicht
n	Anzahl
n	Stoffmenge
n	nano
nat	nativ
PEI	Polyethylenimin
Q	Ladungsmenge [C]
r	Korrelationskoeffizient
rec	rekombinant (engl.: recombinant)
REM	Rasterelektronen-Mikroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
s	Sekunde
SDS	Sodium-dodecylsulfate
t	Zeit
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit
UBICON	Universelles Bioprozess-Kontroll-System (engl.: Universal bioprocess control system)
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
vs	versus (lat.: gegen)
W	Arbeitselektrode (engl.: working electrode)
w/v	Masse pro Volumen (engl.: weight/volume)
w/w	Masse pro Masse (engl.: weight/weight)
YS	Yellow-Springs
z	elektrochemisches Äquivalent
ZKT	Zellkulturtechnik
μ	mikro

7 LITERATUR

- [1] H.-J. Verlohren, T. Ziegler und T. Nitsche:
Comparative Study of Small Sample Volume Effects with Blood Glukose Meters for Self Monitoring,
34th Annual Meeting Barcelona 8.-12. September 1998, EASD 98.
- [2] M.H. Keyes, F.E. Semersky, D.N. Gray:
Glucose analysis utilizing immobilized enzymes,
Enzyme Microb. Technol. 1 (1979) 91-94.
- [3] I.C. Popescu, G. Zetterberg, L. Gorton:
Influence of graphite powder, additives and enzyme immobilization procedures on a mediatorless HRP-modified carbon paste electrode for amperometric flow-injection detection of H_2O_2 ,
Biosens. Bioelectron. 10 (1995) 443-461.
- [4] J. Zhao, R.W. Henkens, J. Stonehuerner, J.P. O'Daly, A.L. Crumbliss:
Direct electron transfer at horseradish peroxidase-colloidal gold modified electrodes,
J. Electroanal. Chem. 327 (1992) 109-119.
- [5] G. Jönsson-Pettersson:
Reagentless hydrogen peroxide and glucose sensors based on peroxidase immobilized on graphite electrodes,
Electroanalysis 3 (1991) 741-750.
- [6] J.J. Kulys, A.S. Samalius:
692-dependence of the efficiency of the bioelectrocatalytic processes on the electrode surface state,
Bioelectrochem. Bioenerg. 13 (1984) 163-169.
- [7] T.D. Gibson, I.J. Higgins, J.R. Woodward:
Stabilization of analytical enzymes using a novel polymer-carbohydrate system and the production of a stabilized, single reagent for alcohol analysis,
Analyst 117 (1992) 1293-1297.
- [8] N. Larsson, L. Gorton:
The effect of various polyelectrolytes on alcohol oxidase/horseradish peroxidase/ferrocene modified carbon paste electrodes,
Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A, 3, 1997.
- [9] M. Gajhede, D.J. Schuller, A. Henriksen, A.T. Smith, T.L. Poulos:
Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution,
Nat. Struct. Biol. 4, 12 (1997) 1032-1038.
- [10] P. Tijssen:
Practice and theory of enzyme immunoassays,
aus: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology,
Vol. 15, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, New York, 1985.
- [11] A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson:
Biosensors - Fundamentals and Applications,
Oxford University Press, Oxford, 1987.

- [12] D. Savitri, C.K. Mitra:
Role of mediators in electron transport from glucose oxidase redox centre to electrode surface in a covalently coupled enzyme paste electrode,
J. Biosci. 24, 1 (1999) 43-48.
- [13] M.S. Lin, W.C. Shih:
Chromium hexacyanoferrate based glucose biosensor,
Anal. Chim. Acta 381 (1999) 183-189.
- [14] T. Krawczynski vel Krawczyk, M. Trojanowicz, A. Lewenstam, A. Moszczynska:
Lactate solid-state biosensor with multilayer of electrodeposited polymers for flow-injection clinical analysis,
Biosens. Bioelectron. 11 [11] (1996) 1155-1165.
- [15] K. Hirano, H. Yamato, K. Kunitomo, M. Ohwa:
Novel electron transfer mediators based on dichloroindophenol derivatives for lactate oxidase,
J. Electroanal. Chem. 510 (2001) 149-152.
- [16] A. Morales, F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret:
Ethanol amperometric biosensor based on an alcohol oxidase-graphite-polymer biocomposite,
Electrochimica Acta 23, Vol. 43 (1998) 3575-3579.
- [17] H. Gunasingham, C.-H. Tan, H.-M. Ng:
Pulsed amperometric detection of glucose using a mediated enzyme electrode,
J. Electroanal. Chem. 287 (1990) 349-362.
- [18] H. Gunasingham, C.-H. Tan:
Mediated enzyme/wall-jet amperometric electrode in flow-injection monitoring of glucose,
Electroanalysis 1 (1989) 423-429.
- [19] H.-L. Schmidt, W. Schuhmann:
Reagentless oxidoreductase sensors,
Biosens. Bioelectron. 11 (1996) 127-135.
- [20] H.-L. Schmidt, F. Gutberlet, W. Schuhmann:
New principles of amperometric enzyme electrodes and of reagentless oxidoreductase biosensors,
Sensors and Actuators B 13-14 (1993) 366-371.
- [21] B. Lu, E.I. Iwuoha, M.R. Smyth, R. O'Kennedy:
Development of an "electrically wired" amperometric immunosensor for the determination of biotin based on a non-diffusional redox osmium polymer film containing an antibody to the enzyme label horseradish peroxidase,
Anal. Chim. Acta 345 (1997) 59-66.
- [22] Y. Okawa, M. Nagano, S. Hirota, H. Kobayashi, T. Ohno, M. Watanabe:
Tethered mediator biosensor. Mediated electron transfer between redox enzyme and electrode via ferrocene anchored to electrode surface with long poly(oxyethylene) chain,
Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 229-235.
- [23] T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga:
Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application (review),
Anal. Chim. Acta 330 (1996) 123-138.
- [24] K. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann:
Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors (Review),
Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 560-568.

- [25] W. Schuhmann, H. Zimmermann, K. Habermüller, V. Laurinavicius:
Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces: Reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes,
Faraday Discuss. 116 (2000) 245-255.
- [26] E.S. Medvedev, A.A. Stuchebrukhov:
Inelastic tunneling in long-distance biological electron transfer reactions,
J. Chem. Phys. 107, 10 (1997) 3821-3831.
- [27] T. Yao, I. Harada, T. Nakahara:
Enzyme sensors based on a direct electron transfer between graphite electrode and adsorbed horseradish peroxidase,
Analytical Sciences 11 (1995) 685-687.
- [28] L.-H. Guo, H.A.O. Hill:
Direct electrochemistry of proteins and enzymes,
Adv. Inorg. Chem. 36 (1991) 341-375.
- [29] W. Schuhmann:
Einsatz von Mediatoren und leitenden Polymeren in amperometrischen Enzymelektroden - Möglichkeiten und Probleme,
in: Elektrochemische Sensorik: Neues aus Forschung und Anwendung, Dechema-Monographie Bd. 126, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.
- [30] H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann, L. Gorton:
Anisotropic orientation of horseradish peroxidase by reconstitution on a thiol-modified gold electrode,
Chem. Eur. J. 6, 4 (2000) 592-599.
- [31] D.N. Beratan, S.S. Skourtis:
Electron transfer mechanisms,
Curr. Opin. Chem. Biol., Bd. 2, 1998, 2, 235.
- [32] J. Wang, B. Freiha, N. Naser, E. Gonzalez Romero, U. Wollenberger, M. Ozsoz:
Amperometric biosensing of organic peroxides with peroxidase-modified electrodes,
Anal. Chim. Acta 254 (1991) 81-88.
- [33] J.N. Rodríguez-López, M.A. Gilabert, J. Tudela, R.N.F. Thorneley, F. García-Cánovas:
Reactivity of Horseradish Peroxidase Compound II toward substrates: kinetic evidence for a two-step mechanism,
Biochemistry 39 (2000) 132001-13209.
- [34] S.A. Wring:
Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds - a review,
Analyst 117 (1992) 1215-1229.
- [35] P.D. Sánchez, P.T. Blanco, J.M.F. Alvarez, M.R. Smyth, R. O'Kennedy:
Flow-injection analysis of hydrogen peroxide using a horseradish peroxidase-modified electrode detection system,
Electroanalysis 2 (1990) 303-308.
- [36] S.L. Chut, J. Li, S.N. Tan:
Reagentless amperometric determination of hydrogen peroxide by silica sol-gel modified biosensor,
Analyst 122 (1997) 1431-1434.

- [37] S.A. Adediran, A.-M. Lambeir:
Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III,
Eur. J. Biochem. 186 (1998) 571-576.
- [38] R. Wei Min, V. Rajendran, N. Larsson, L. Gorton, J. Planas, B. Hahn-Hägerdal:
Simultaneous monitoring of glucose and L-lactic acid during a fermentation process in an aqueous two-phase system by on-line FIA with microdialysis sampling and dual biosensor detection,
Anal. Chim. Acta 366 (1998) 127-135.
- [39] H.B. Dunford:
Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties,
in: *Peroxidases in Chemistry and Biology Vol. II*, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- [40] S.A. Kane, E.I. Iwuoha, M.R. Smyth:
Development of a sol-gel based amperometric biosensor for the determination of phenolics,
Analyst 123 (1998) 2001-2006.
- [41] O. Adeyolu, E.I. Iwuoha, M.R. Smyth:
Amperometric determination of butanone peroxide and hydroxylamine *via* direct electron transfer at a horseradish peroxidase-modified platinum electrode,
Analytical Proceedings Including Analytical Communications 31 (1994) 177-179.
- [42] A.I. Yaropolov, V. Malovik, S.D. Varfolomeev, I.V. Beresin:
Bioelectrocatalysis. Direct electron transfer from peroxidase active site to electrode,
Dokl. Akad. Nauk. UdSSR 260, 1192-1195.
[zitiert in: S.D. Varfolomeev, I.N. Kurochkin, A.I. Yaropolov:
Direct electron transfer effect biosensors,
Biosens. Bioelectron. 11, Vol. 9 (1996) 863-871.]
- [43] M.N. Gupta:
Thermostabilization of proteins (Review),
Biotechnol. Appl. Biochem. 14 (1991) 1-11.
- [44] C.Ó Fágáin:
Understanding and increasing protein stability (Review),
Biochim. Biophys. Acta 1252 (1995) 1-14.
- [45] G. Löffler, P.E. Petrides:
Biochemie und Pathobiochemie,
Springer-Verlag, 5. Auflage, Berlin, 1997.
- [46] A.J. Schütz, M. Winklmaier, M.G. Weller, R. Niessner:
Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) for the use in immunochemical sensors,
SPIE 3105 (1997) 332-340.
- [47] T.D. Gibson, J.N. Hulbert, S.M. Parker, J.R. Woodward, I.J. Higgins:
Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system,
Biosens. Bioelectron. 7 (1992) 701-708.
- [48] V.G. Gavalas, N.A. Chaniotakis:
Polyelectrolyte stabilized oxidase based biosensors: effect of diethylaminoethyl-dextran on the stabilization of glucose and lactate oxidase into porous conductive carbon,
Anal. Chim. Acta 404 (2000) 67-73.

-
- [49] J. Liu, J. Wang:
Remarkable thermostability of bioelectrodes based on enzymes immobilised within hydrophobic semi-solid matrices,
Biotechnol. Appl. Biochem. 30 (1999) 177-183.
- [50] A. Dankwardt, J. Müller, B. Hock:
Stabilization of enzyme immunoassays for atrazine,
Anal. Chim. Acta 362 (1998) 35-45.
- [51] C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan:
Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment,
Enzyme Microb. Tech. 26 (2000) 509-515.
- [52] J. Xu, Q. Feng, H. Dong, Y. Wei:
Stability of immobilized horseradish peroxidase in mesoporous silica sol-gel materials,
Polymer Preprints 41 [1] (2000) 1046-1047.
- [53] W. Hartmeier:
Immobilisierte Biokatalysatoren,
Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- [54] Y. Cho, S. Han:
Catalytic activities of glass-encapsulated horseradish peroxidase at extreme pHs and temperatures,
Bull. Korean. Chem. Soc. 20 [11] (1999) 1363-1364.
- [55] S. Kanaya:
Stabilization of an enzyme with protein engineering technology,
Biotechnol. Sustainable Util. Biol. Resour. Trop. 14 (2000) 186-192.
- [56] R. Holze:
Leitfaden der Elektrochemie,
Teubner, Stuttgart, 1998.
- [57] C.H. Hamann, W. Vielstich:
Elektrochemie,
Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
- [58] K.-H. Näser, D. Lempe, O. Regen:
Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure,
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1988.
- [59] M. Prudenziati (Editor):
Handbook of Sensors and Actuators,
Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [60] H. Reichl:
Hybridintegration,
Hüthig Verlag, Heidelberg, 1988.
- [61] P. Rüger:
Amperometrische Enzymsensoren auf der Basis der Dickschichttechnologie,
Dissertation, TU Braunschweig, 1992.

-
- [62] M. Stiene:
Elektrochemische Detektion von Virusinfektionen am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest,
Dissertation, TU Braunschweig, 1997.
- [63] A. Schmidt, I. Rohm, P. Rüger, W. Weise, U. Bilitewski:
Application of screen printed electrodes in biochemical analysis,
Fresenius J. Anal. Chem. 349 (1994) 607-612.
- [64] U. Bilitewski:
Screen-printing technology - a tool for mass production of enzyme electrodes,
in: Trends in Electrochemical Biosensors, G. Costa & S. Miertus (Hrsg.), World Scientific,
Singapur, 1992.
- [65] I. Rohm:
Entwicklung amperometrischer Enzymsensoren in Siebdrucktechnik und ihr Einsatz mittels
Mehrkanal-Fließinjektionsanalyse in der *on-line* Bioprozeßüberwachung,
Dissertation, TU Braunschweig, 1996.
- [66] H. Chmiel:
Bioprozeßtechnik 1,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991.
- [67] H. Bühler:
Messen in der Biotechnologie,
Hüthig-Verlag, Heidelberg, 1985.
- [68] J. Ruzicka, E.H. Hansen:
Flow Injection Analysis,
Wiley, New York, 1988.
- [69] M. Valcarcel, M.D. Luque de Castro:
Flow-Injection Analysis, Principles and Applications,
Ellis Horwood, Chichester, 1987.
- [70] M. Stiene, U. Bilitewski:
A new software for controlled on-line monitoring and routine measurement with flow-injection
analysis,
Proceedings of the 7th Congress on Biotechnology, Societe Francaise de Microbiologie, Paris,
3 (1995) MEP 174
Version fia-fox 2.11, GBF, 1994.
- [71] B. Sonnleitner:
Bioprocess automation and bioprocess design,
J. Biotechnol. 52 (1997) 175-179.
- [72] K. Schügerl:
Which requirements do flow injection analyzer / biosensor systems have to meet for controlling
the bioprocess?,
J. Biotechnol. 31 (1993) 241-256.
- [73] J.J. van der Pol:
On-line Monitoring and Control of Animal-Cell Cultures,
Dissertation, Universität Wageningen, Niederlande, 1996.
- [74] K. Schügerl, L. Brandes, X. Wu, J. Bode, J.I. Re, J. Brandt, B. Hitzmann:
Monitoring and control of recombinant protein production,
Anal. Chim. Acta 279 (1993) 3-16.

- [75] Bild aus dem Archiv der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der GBF.
- [76] K. Gollmer, T. Gäbel, J. Nothnagel, C. Posten:
UBICON - a universal bioprocess control system,
Dechema Annual Meeting of Biotechnologists 1992, Vol. 5, 353-356.
- [77] G. Pressler:
Regelungstechnik,
Bibliographisches Institut, Hochschultaschenbücher-Verlag, Mannheim, 1965.
- [78] Mann, Schiffelgen:
Einführung in die Regelungstechnik,
Hanser-Verlag, München-Wien, 1989.
- [79] S. Nagano, M. Tanaka, K. Ishimori, Y. Watanabe, I. Morishima:
Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases,
Biochemistry 35 (1996) 14251-14258.
- [80] I.G. Gazaryan, V.V. Doseeva, A.G. Galkin, V.I. Tishkov:
Effect of single-point mutations Phe41→His and Phe43→Glu on folding and catalytic properties of recombinant horseradish peroxidase expressed in *E. coli*,
FEBS letters 354 [3] (1994) 248-250.
- [81] S. Allen, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams:
Atomic force microscopy in analytical biotechnology,
Tibtech 15 (1997) 101-105.
- [82] H.M. Kalisz, H.-J. Hecht, D. Schomburg, R.D. Schmidt:
Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*,
Biochim. Biophys. Acta 1080 (1991) 138-142.
- [83] P.D. Josephy, T. Eling, R.P. Mason:
The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine,
J. Biol. Chem. 257 [7] (1982) 3669-3675.
- [84] C.C. Page, C.C. Moser, X. Chen, P.L. Dutton:
Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction,
Nature 402 (1999) 47-52,
http://www.med.upenn.edu/biocbiop/local_pages/dutton_lab/golden.html.
- [85] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig:
Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons,
Proteins 11 [4] (1991) 281-296.
- [86] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson:
Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function,
J. Comp. Chem. 19 [14] (1998) 1639-1662.
- [87] M. Gajhede, D.J. Schuller, A. Henriksen, A.T. Smith, T.L. Poulos:
Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution,
Nat. Struct. Biol. 4 [12] (1997) 1032-1038.

-
- [88] A. Bohne, E. Lang, C.W. von der Lieth:
W3-SWEET: Carbohydrate modeling by internet,
Int. J. Mol. Model. 4 (1998) 33-43,
<http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweet2/doc/index.html>.
- [89] J.S. Gray, B.Y. Yang, R. Montgomery:
Heterogeneity of glycans at each N-glycosylation site of horseradish peroxidase,
Carbohydrate Res. 311 (1998) 61-69.
- [90] D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham III, W.S. Ross, C.L. Simmerling,
T.A.T.A. Darden, K.M. Merz, R.V. Stanton, A.L. Cheng, J.J. Vincent, M. Crowley, D.M.
Ferguson, R.J. Radmer, G.L. Seibel, U.C. Singh, P.K. Weiner, P.A. Kollman:
Amber 5,
University of California, San Francisco, 1997,
<http://www.amber.ucsf.edu/amber/index.html>.
- [91] P.J. Kraulis:
MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures,
J. Appl. Cryst. 24 (1991) 946-950.
- [92] D. Schomburg, J. Reichelt:
BRAGI: A comprehensive protein modeling program system,
J. Mol. Graphics 6 [3] (1988) 161-165.
- [93] A. Günther, U. Bilitewski:
Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-
injection system,
Anal. Chim. Acta 300 (1995) 117-125.
- [94] V. Jäger, J. Lehmann, P. Friedl:
Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred
bioreactors,
Cytotechnology 1 (1988) 319-329.
- [95] M. Ganzlin:
Untersuchung der induzierten Proteinproduktion unter Kontrolle des Glucoamylasepromotors in
Aspergillus niger bei Verwendung des fluoreszierenden Reporterproteins S65TGFP,
Dissertation, TU Braunschweig, 2001.
- [96] M. Holtzhauer:
Biochemische Labormethoden,
Springer-Verlag, Berlin, 1995.
- [97] J.W. Tams, K.G. Welinder:
Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase,
FEBS Letters 421 (1998) 234-236.
- [98] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson:
Molekularbiologie der Zelle,
VCH-Verlag, Weinheim, 1995.
- [99] L. Stryer:
Biochemie,
Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- [100] Biochemicals for glycoprotein and carbohydrate research,
in: Glycohydrolases, Boehringer Mannheim GmbH.

- [101] N. Takahashi, K.B. Lee, H. Nakagawa, Y. Tsukamoto, K. Masuda, Y.C. Lee:
New *N*-glycans in horseradish peroxidase,
Anal. Biochem. 255, 2 (1998) 183-187.
- [102] J.H. Pazur, K. Kleppe:
The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*,
Arch. Biochem. Biophys. 111 (1964) 351-357.
- [103] H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg:
Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution,
J. Mol. Biol. 229 (1993) 153-172.
- [104] R.B. van Huystee, M.T. McManus:
Glycans of higher plant peroxidases: recent observations and future speculations,
Glycoconjugate Journal 15 (1998) 101-106.
- [105] A. Kurosaka, A. Yano, N. Itoh, Y. Kuroda, T. Nakagawa, T. Kawasaki:
The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by
anti-horseradish peroxidase antiserum,
J. Biol. Chem. 266, 7 (1991) 4168-4172.
- [106] C.Ó. Fágáin:
Stabilizing Protein Function,
Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- [107] A.T. Smith, N. Santama, S. Dacey, M. Edwards, R.C. Bray, R.N.F. Thorneley, J.F. Burke:
Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase *C* in *Escherichia coli* and folding and
activation of the recombinant enzyme with Ca^{++} and heme,
J. Biol. Chem. 265, 22 (1990) 13335-13343.
- [108] K. Chattopadhyay, S. Mazumdar:
Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH,
Biochemistry 39 (2000) 263-270.
- [109] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson:
Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report),
Biosens. Bioelectron. 16 (2001) 121-131.
- [110] P. Karlson:
Biochemie,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1980.
- [111] I. Yamazaki, M. Tamura, R. Nakajima:
Horseradish peroxidase *C*,
Mol. Cell. Biochem. 40 (1981) 143-153.
- [112] V.G. Gavalas, N.A. Chaniotakis, T.D. Gibson:
Improved operational stability of biosensors based on enzyme-polyelectrolyte complex
adsorbed into a porous carbon electrode,
Biosens. Bioelectron. 13 (1998) 1205-1211.
- [113] J.R. Woodward, T.D. Gibson, S. Parker:
Interactions of proteins and stabilizers in biosensor systems,
Proc. Electrochem. Soc. 93 [7] (1993) 746-762.

- [114] T.D. Gibson, B.L.J. Pierce, S.M. Parker:
Stabilisation of the biological component of biosensors,
Spec. Publ. R. Soc. Chem. (1998) 46-53.
- [115] T.D. Gibson, B.L.J. Pierce, J.N. Hulbert, S. Gillespie:
Improvements in the stability characteristics of biosensors using protein-polyelectrolyte complexes,
Sensors and Actuators B 33 (1996) 13-18.
- [116] L. Gorton, G. Jönsson-Pettersson, E. Csöregi, K. Johansson, E. Domínguez, G. Marko-Varga:
Amperometric biosensors based on an apparent direct electron transfer between electrodes and immobilized peroxidases,
Analyst 117 (1992) 1235-1241.
- [117] X.-J. Tang, B. Xie, P.-O. Larsson, B. Danielsson, M. Khayyami, G. Johansson:
Polyethyleneimine-coated reticulated vitreous carbon electrode with immobilized enzymes as a substrate detector,
Anal. Chim. Acta 374 (1998) 185-190.
- [118] K.G. Welinder:
Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase,
Eur. J. Biochem. 96 (1979) 483-502.
- [119] E. Csöregi, G. Jönsson-Pettersson, L. Gorton:
Mediatorless Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide at Graphite Electrodes Chemically Modified with Peroxidases,
J. Biotechnol. 30 (1993) 315-337.
- [120] Y. Guo, A.R. Guadalupe:
Direct electrochemistry of horseradish peroxidase adsorbed on glassy carbon electrode from organic solutions,
Chem. Commun. (1997) 1437-1438.
- [121] T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emnéus, G. Marko-Varga:
Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode,
J. Electroanal. Chem. 392 (1995) 41-49.
- [122] G. Jönsson, L. Gorton:
An electrochemical sensor for hydrogen peroxide based on peroxidase adsorbed on a spectrographic graphite electrode,
Electroanalysis 1 (1998) 465-468.
- [123] J. Kulys, U. Bilitewski, R.D. Schmid:
Robust graphite-based bienzyme sensors,
Sensors and Actuators B 3 (1991) 227-234.
- [124] A. Lindgren, M. Tanaka, T. Ruzgas, L. Gorton, I. Gazaryan, K. Ishimori, I. Morishima:
Direct electron transfer catalysed by recombinant forms of horseradish peroxidase: insight into the mechanism,
Electrochem. Comm. 1 (1999) 171-175.
- [125] E.E. Ferapontova, V.G. Grigorenko, A.M. Egorov, T. Borchers, T. Ruzgas, L. Gorton:
Direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase,
J. Electroanal. Chem. 509 (2001) 19-26.

- [126] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csöregi, G.B. Ardila, I.Y. Sakharov, I.G. Gazaryan: Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 491-497.
- [127] U. Wollenberger, J. Wang, M. Ozsoz, E. Gonzalez-Romero, F. Scheller: Bulk modified enzyme electrodes for reagentless detection of peroxides, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 26 (1991) 287-296.
- [128] J.D. Wright, K.M. Rawson, W.O. Ho, D. Athey, C.J. McNeil: Specific binding assay for biotin based on enzyme channelling with direct electron transfer electrochemical detection using horseradish peroxidase, *Biosens. Bioelectron.* 10 (1995) 495-500.
- [129] T. Tatsuma, K. Ariyama, N. Oyama: Kinetic analysis of electron transfer from a graphite coating to horseradish peroxidase, *J. Electroanal. Chem.* 446 (1998) 205-209.
- [130] J.T. Schumacher, I. Münch, T. Richter, I. Rohm, U. Bilitewski: Investigations with respect to stabilization of screen-printed enzyme electrodes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1-4, Vol. 7 (1999) 67-76.
- [131] K. Scharfenberg, R. Wagner: in: *Animal cell technology: developments towards the 21st century*, E.C. Beuvery, J.B. Griffiths, W.P. Zeijlemaker (eds.), Kluwer, Dordrecht, Niederlande, 1995.
- [132] L. dos Reis Castilho: Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells, Dissertation, TU Braunschweig, 2001.
- [133] L.R. Castilho, J.T. Schumacher, J. Nothnagel, F.B. Anspach, W.D. Deckwer: Automated perfusion cultivation of CHO cells for the production of a recombinant human anti-HIV antibody, *Jahrestagung der Brasilianischen Gesellschaft für Biotechnologie* (November 2001).
- [134] K.B. Konstantinov, Y.T. Tsai, D. Moles, R. Matanguihan: Control of long-term perfusion chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat, *Biotechnol. Progr.* 12 (1996) 100-109.
- [135] N. Torto, T. Laurell, L. Gorton, G. Marko-Varga: Recent trends in the application of microdialysis in bioprocesses, *Anal. Chim. Acta* 379 (1999) 281-305.